

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A )

(11) 特許出願公表番号

特表平7-508881

第1 部門第1 区分

(43) 公表日 平成7 年(1995)10月5日

|                                   |                             |          |   |
|-----------------------------------|-----------------------------|----------|---|
| (51) Int.Cl. <sup>4</sup>         | 識別記号                        | 庁内整理番号   | F I   |
| C 1 2 P 21/02                     | Z N A C                     | 9282-4B  |   |
| C 1 2 N 1/19                      |                             | 882S-4B  |   |
| 9/90                              |                             | 9152-4B  |   |
| 15/09                             |                             | 9281-4B  | C 1 2 N 15/ 00 A  |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く |                             |          |   |
| (21) 出願番号                         | 特願平6-501587                 | (71) 出願人 | メルク エンド カンパニー インコーポ<br>レーテッド<br>アメリカ合衆国, ニュージャーシ<br>07065, ローウエイ, イースト リンカー<br>ン アヴェニュー 128     |
| (86) (22) 出願日                     | 平成5 年(1993)6月2日             | (71) 出願人 | ユニバーシティー・オブ・ケント・アッ<br>ト・カンタベリー<br>イギリス国, ケント・シー・ティー・2・<br>7・エヌ・ゼット, カンタベリー, ザ・レ<br>ジストリー (番地なし) |
| (85) 翻訳文提出日                       | 平成6 年(1994)12月12日           | (74) 代理人 | 弁理士 川口 義雄 (外2名)   |
| (86) 国際出願番号                       | P C T / U S 9 3 / 0 5 3 1 8 |          |   |
| (87) 国際公開番号                       | W O 9 3 / 2 5 6 7 6         |          |   |
| (87) 国際公開日                        | 平成5 年(1993)12月23日           |          |   |
| (31) 優先権主張番号                      | 9 0 1 , 7 1 3               |          |   |
| (32) 優先日                          | 1992年6月12日                  |          |   |
| (33) 優先権主張国                       | 米国 ( U S )                  |          |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サッカロミセスレベシニアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

(57) 【要約】

酵母によって産生されるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質、特に組換え分泌タンパク質の収率を増加させる方法を開示する。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ ( P D I ) 酵素は分泌及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成を触媒する。ここでは、ヒト P D I 又は酵母 P D I を調節的に過剰産生する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の組換え株の構築を開示する。これらの株は、治療面で潜在的に重要なジスルフィド結合をもつタンパク質を極めて多量に分泌する。これらの株は、ジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質の産生を増加させる可能性を有する。

**請求の範囲**

1. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
  - (a) 組換え宿主内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを発現させるステップ、及び
  - (b) 前記組換え宿主内で、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ
 を含むことを特徴とする前記方法。
2. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え宿主が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素をコードする組換え発現カセットのコピーを一つ以上含む請求項1に記載の方法。
3. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項2に記載の方法。
4. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが当誌的複製プラスミド上に含まれている請求項2に記載の方法。
11. 酵母が *Saccharomyces cerevisiae* 又は *Cryptococcus neoformans* 科の属の株である請求項10に記載の方法。
12. 酵母が *Saccharomyces* 属の菌である請求項11に記載の方法。
13. 酵母が *Saccharomyces cerevisiae* 又は *Cryptococcus neoformans* 科の属の株である請求項12に記載の方法。
14. ステップ(b)の組換え遺伝子がアンチセンスである請求項1に記載の方法。
15. ステップ(b)の組換え遺伝子がマダニ抗凝血タンパク質である請求項1に記載の方法。
16. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。
17. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項1に記載の方法。
18. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項17に記載の方法。

**特表平7-508881 (2)**

5. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が、一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項1に記載の方法。
6. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項1に記載の方法。
7. ステップ(b)のジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項1に記載の方法。
8. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項5に記載の方法。
9. ステップ(a)の組換え宿主が哺乳動物である請求項1に記載の方法。
10. ステップ(a)の組換え宿主が酵母である請求項1に記載の方法。
19. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
  - (a) 組換え酵母宿主細胞内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生するステップ、及び
  - (b) 前記組換え宿主内で、分枝ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ
 を含むことを特徴とする前記方法。
20. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。
21. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項19に記載の方法。
22. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項21に記載の方法。
23. ステップ(a)でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え酵母宿主が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする組換え発現カセットのコ

ローを一つ以上含む請求項18に記載の方法。

24. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが酵母宿主細胞ゲノムに組み込まれる請求項23に記載の方法。

25. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが自律的複製プラスミド上に含まれている請求項23に記載の方法。

26. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつタンパク質をコードする組換え遺伝子が一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項18に記載の方法。

27. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項18に記載の方法。

28. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母宿主を30℃以下の温度で増殖する請求項18に記載の方法。

29. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母を約20℃～25℃の温度で

増殖する請求項28に記載の方法。

30. ジスルフィド結合をもつタンパク質がアンチスタンである請求項29に記載の方法。

31. ジスルフィド結合をもつタンパク質がマダニ抗凝血タンパク質である請求項29に記載の方法。

32. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の株。

33. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

34. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

## 明 細 書

サッカロミセスセレンシアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

### 発明の背景

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、分泌タンパク質及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成に関わる酵素である。哺乳動物PDIの保存された(coussens et al.)「チオレドキシン様」活性部位を模倣するように設計されたオリゴヌクレオチド(WCGHCK)(配列番号:1)を用いて、本発明者らは下等真核生物 *Saccharomyces cerevisiae* 18a からPDIをコードする遺伝子を単離した。クローニングした遺伝子のヌクレオチド配列及び推定翻訳枠は、分子量9,082及びpI=4.1の530アミノ酸からなるタンパク質を予測させるが、これらは哺乳動物PDIの物理的物性である。また、アミノ酸配列は哺乳動物及び鳥類のPDI配列に対して30～32%の同一性と53～56%の類似性を示し、全体的構造が極めて類似しており、特に、各々が可変性である二つの100残基セグ

メントが存在する。哺乳動物及び鳥類のPDIに対する最も大きな相同性は、保存された「チオレドキシン様」活性部位を含む領域(a, a')にある。N末端領域は翻訳可能な分画シグナル配列の特徴を有しており、C末端の4個のアミノ酸(-HDBL)(配列番号:2)は、該タンパク質がS. *cerevisiae* 小胞体(E. R.)の成分であるということと合致している。この遺伝子(PDI1と称する)の複製のコピーを有する形態転換体は10倍のPDI活性レベルを有し、予測された分子量のタンパク質を過剰発現する。PDI1遺伝子は酵母ゲノム内で非反復性であり、定常期細胞には存在せず、また無誘導でもできない単一の1.8kb転写体をコードする。PDI1遺伝子の塩基はハプロ型形性(haplotype)であり、これは該遺伝子の産物が生育能力(viability)にとって必須のものであることを意味する。

チオール:ジスルフィド交換反応を触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、分泌細胞のE. R. 内腔(lumen)の主要なタンパク質成分である。該酵素の細胞内、細胞下の位置及び発現状態に関して立証された一連の事実は、該酵素が分泌タンパ

特表平7-508881 (4)

タンパク質の生合成である糖の役割を果たすことを示唆しており (Freeman, 1984, Trends Biochem. Sci., 9, pp. 438-441), これはその場での (in situ) 直接的な糖結合の研究によって裏付けされている (Roth及びPierce, 1987, Biochemistry, 26, pp. 4179-82)。PDIを欠失しているミトソーム菌が同時翻訳 (co-translational) タンパク質のジスルフィド形成の特異的欠如を示すという発見は (Bullis及びFreeman, 1988, Nature, 335, pp. 649-51), 硫黄素が分泌及び細胞膜タンパク質の生合成の間に二硫スルフィド結合形成の触媒として機能することを意味する。この役割は、硫黄素のチオール基の触媒活性について知られている事実、即ち硫黄素がチオール:ジスルフィド交換反応を触媒して正味のタンパク質ジスルフィドの形成、破壊又は異位化を生起させ、且つ多数にわたる還元され且つ折り畳みのないタンパク質基質においてタンパク質の折り畳み及び本来のジスルフィド結合の形成を触媒することができるという事実と一致している (Freemanら, 1989, Biochem. Soc. Symp., 55, pp. 167-192)。

硫黄素のDNA及びアミノ酸配列は幾つかの種について知られており (Schereena, B. 等, 1991, Yeast, 7, pp. 185-198; Farquhar, R. 等, 1991, Gene, 108, pp. 81-89)、哺乳動物の肝臓から単製して均質にした硫黄素の作用のメカニズムに関する情報も増えている (Croisat et al., 1989, J. Mol. Biol., 142, pp. 43-52; Freemanら, 1988, Biochem. Soc. Trans., 16, pp. 96-9; Gilbert, 1989, Biochemistry, 28, pp. 7298-7305; Lundstrom及びHolmgren, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9214-9220; Hawkins及びFreeman, 1990, Biochem. J., 275, pp. 385-399)。組織におけるタンパク質の折り畳み、アセンブリー及びトランスロケーションの仲介物質として現在推定されている多くのタンパク質因子 (Rothman, 1989, Cell, 59, 591-601) のうち、PDIは明確に規定された

触媒活性を有するという点で希有である。

PDIは哺乳動物の組織から容易に分離され、均質酵素は特異的な二硫 (4, 9-4, 5) を有するホモダイマー (homodimer) (2×57kD) である (Hillisonら, 1984, Molec. Enzymol., 107, pp. 283-292)。硫黄素はコムギ及び病原 *Chlamydomonas reinhardtii* から精製された (Kasakaら, 1990, Biochem. J., 268, pp. 63-68)。活性は広範囲の組織で検出されており、予備報告では、PDI活性は *scorevija* において検出可能であると報告された (Williamsら, 1988, FEBS Lett., 2, pp. 133-135)。最近になって、クローニングしたcDNA配列に基づいて由来する多くのPDIの完全アミノ酸配列が報告された。その中には、マウス由来 (Edmanら, 1988, Nature, 332, pp. 267-270)、ウシ由来 (Yamauchiら, 1987, Biochem. Biophys. Res. Comm., 149, pp. 1485-1492)、ヒト由来 (Pihlajaniemiら, 1987, Biochem. Soc. Symp., 55, pp. 167-192)。

B. J., 2, pp. 643-9)、酵母由来 (Schereena, B. 等, 前出引用文献; Farquhar, R. 等, 前出引用文献) 及びヒヨコ由来 (Parkkonenら, 1988, Biochem. J., 254, pp. 1005-1011) のPDIがある。これらの脊椎動物種に由来するタンパク質は全体を通して高度の配列保存を来し、いずれも、最初にマウスPDI配列で精製された幾つかの終局的特徴を示す (Edmanら, 1988, 前出引用文献)。最も顕著なものは、互いに極めて相同であり且つチオレドキシン、即ち硫黄素Cys残基の間に形成された活性部位ジスルフィド/チオール基を含む小さいドックタス活性タンパク質に密接に関連した配列を有する残基数約100の二つの領域がPDI配列中に存在することである。チオレドキシンでは活性部位配列がECGPCK (配列番号: 3) であり、PDI中に二つ存在する対応する領域は配列 <sup>W</sup>ECGCK (配列番号: 1) を有する (PDI配列中で同定された他の変換領域、モチーフ及び官能性については後で説明する)。

PDIに対応するか又は密接に関連した配列は、ジスルフィド結合の形成以外の機能の分析を目的とする研究で関

定された。例えば、PDIが、E、R、内の新生 (nascent) すなわち新合成 (nascent) プロコラーゲンポリペプチドの主な翻訳後修飾を触媒する塩基性 $\alpha_2\beta_2$ 酵素プロリン-4-ヒドロキシラーゼの $\beta$ サブユニットとして作用するという事実が立証されている (Pillay & Jalkanen, 1987, 前掲引用文献: Kojima, 1987, J. Biol. Chem., 262, pp. 6447-49)。また、PDIが同種翻訳のN-グリコシル化のシステムに関与することを示唆する事実もあり (Geetha-Habib, 1988, Cell, 54, pp. 63-68)、最近では、該酵素が、トリグリセリドを新生分泌リポタンパク質に交換する複合体に関与しているという説も出ている (Wakitani et al., 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9899-7)。このように、PDIは分泌タンパク質の同時翻訳及び翻訳後修飾で複数の機能を果たし得る (Freedman, 1989, Cell, 57, pp. 1069-72)。

哺乳動物分泌タンパク質の大多数は、糖鎖の分子内及び/又は分子間ジスルフィド結合を有している。非限定例を

挙例としては、下着体セルケン、インターロイキン、免疫グロブリン、プロテアーゼ及びその阻害物質、並びに他の血漿タンパク質が挙げられる。この種のタンパク質は産業的造紙化学工業の主要原料の一つであるが、細胞及び肝臓内でのこれらのタンパク質の発現における初期の体験では、これらのタンパク質を過剰的に活性な組織変性物として得る上で多くの問題があることが指摘された。その結果、一般的には組織修飾的、特定のにはタンパク質の折り畳み及びジスルフィド結合形成をより深く解明する必要が認識されるようになった。

単一の折り畳みドメインを有するジスルフィド結合をもつタンパク質は通常、正確にジスルフィド結合した状態を最適な収率で形成するためには、完全に還元、酸化し、次いでin vitroで再生することができる。このプロセスでは、ゆっくり異性化して天然のジスルフィド結合を生成する多くの様々にジスルフィド結合した形態の混合集団が迅速に形成される。該プロセスは、チオール/ジスルフィド酸化還元触媒 (例えばGSN及びGSOG) 及びアルカリ性pHによって触媒される。比較及び模倣ジスルフィド形成を防止するためには、タンパク質濃度を低くする必

要がある。通常は、天然タンパク質の生成速度及び実現可能な生産収率はどちらも、分子内ジスルフィド結合の増加に伴って低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれてそれぞれの天然ジスルフィド結合を確立して形成しなければならない複数のジスルフィド結合ドメインを含むタンパク質 (例えば組織プラスミノゲン活性化因子) ではより重大である。

in vivoのジスルフィド結合形成プロセスは、翻訳と同時に、又は極めて早期の翻訳後事象として発起する。哺乳動物細胞のE、R、内腔の翻訳及び新合成分泌タンパク質の研究では、天然ジスルフィド結合が既に形成されていることが判明している。in vivoのプロセスは、分泌細胞内に豊富に存在するタンパク質であり小胞体の内腔面 (luminal face) に局在する酵素、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼによって触媒されると思われる (Freedman, R. B., 1984, Trends in Biochemical Sciences, 9, 438-441)。この酵素はin vitroで、広範囲のタンパク質濃度においてチオール:タンパク質-ジスルフィド交換反応を触媒し、天然タンパク質ジスルフィ

ド形成の細胞様態に必要とされる活性を有する (Freedman, R. B., 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, 989-942)。該酵素の役割を明らかにする別の事項としては、(i) 該酵素の粗製分布がジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成のそれと合致するという事実 (Brockway, B. E., 1980, Biochem. J., 191, 873-876)、及び(ii) 多くの系で、存在する酵素の量が、ジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成速度の生理学的変化に準伴して変化するという事実 (Brockway, B. E., 1980, Biochem. J., 191, 878-876; Freedman, R. B., 1983, "Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological & Clinical Aspects", A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren & B. Mannervik編, Raven Press, New York, pp. 271-282; Paver, J. L., 1989, FEBS Letters, 242, pp. 857-

382) が挙げられる。

該酵素の特性は、多くの動物源 [Lambert, N. 及び Freedman, R. B., 1983, Biochem. J., 213, pp. 225-234] 及びコムギ [de Azevedo, G. M. V. ら, 1983, Biochem. Soc. Trans., 12, 1043] で説明されており、分子構造及び動力学的特性の顕著な保存が観察された [Freedman, R. B. ら, 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, pp. 939-942; Brockway, B. B. 及び Freedman, R. B., 1984, Biochem. J., 219, S1-S9]。しかしながら、該酵素は、高等真核生物又は細菌においてはまだ十分に研究されていない。少なくとも一部の酵母分泌タンパク質 (例えばセラミナーゼ) はジスルフィド結合を含んでいるため、酵母と高等真核生物との間の、分泌に関与するメカニズム及び分子成分の高度の相同性は、該酵素又は類似体が酵母内に存在することを強く示唆させる。

商業的に重要な哺乳動物タンパク質の発現のための万能宿主 (versatile host) としての酵母の使

用は、酵母分泌系の限定された能力、及び産能力と高等真核生物のそれとの相違 (例えばグリコシル化における相違) によって、ある程度の変通を強いられる。

本発明は、酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え宿主細胞内でジスルフィド結合タンパク質を産生するための新規の方法と、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え酵母細胞とを提供する。本発明は、ジスルフィド結合をもつ組換え分泌タンパク質の分泌を実質的に及つ予期外に増加させる組換え酵母宿主細胞も提供する。

#### 発明の概要

ヒト及び酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) をコードする DNA を単離し、プロモーターと転写ターミネーターを含む発現カセット又はベクターにクローニングする。PDI をコードする DNA を含む発現カセット又はベクターを宿主細胞的にトランスファーすると、該細胞は PDI タンパク質を過剰産生する。これらの PDI 過剰産生細胞を、ジスルフィド結合をもつタンパク質の発現のための組換え宿主として使用する。ジスルフィド結合をもつタンパク質の分泌は、PDI 過剰産生宿主細胞では、

通常レベルの PDI を産生する宿主細胞と比べて実質的に増加する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、マルケコビープラスミド上に酵母 PDI をコードする遺伝子を有する S. cerevisiae 形質転換体の無細胞溶液の SDS-PAGE 分析を示している。

第2図は、「COMPARE」及び「DOTPLOT」ソフトウェア (UWGC) を用いた酵母 PDI とラット PDI との間のドットプロットアライメント (dot plot alignment) を示している。哺乳動物 PDI のドメイン構造は同じ規模で前述アライメントの下に示されている。

第3図は、酵母 PDI 遺伝子の発現に関するストラテジー及び結果を示している。パネル (b) は、pdi1::His<sup>+</sup>AS23 変換に対して異型変換株の His<sup>+</sup> AS23 24 株の四分分子 (tetrad) 分析の結果を示す。

第4図はプラスミド pUKC101 の構造を示している。

第5図はプラスミド pUC-ySP-hPDI の構造を示している。

第6図は、pUC18-GAL10p (5) ADHI:

としても知られているプラスミド p401 の構造を示している。

第7図はプラスミド pUC18-GAL10p-yPDI-ADHI の構造を示している。

第8図は、K991 としても知られているプラスミド pKH4α2/ATS の構造を示している。

第9図は YEp24-GAL10p-yPDI の構造を示している。

第10図は YEp24-GAL1p-MFa-hPDI の構造を示している。

第11図は pUC-GAL1/10-hPDI/ATS の構造を示している。

第12図は pUC-GAL1/10-yPDI/ATS の構造を示している。

#### 発明の詳細な説明

酵母におけるタンパク質の折り畳み及び分泌のプロセスは極めて複雑であり、遺伝子研究に就いて言えば、30 以上の遺伝子産物が関与している (Frasca *et al.*, A. ら, 1991, Methods Enzymology, 194, pp. 662-674)。これらの産物とし

では、ペプチジルプロリルシーストランスイソメラーゼ、PDI及び他のチオレドキシシン様タンパク質、BiP、種々の分子シャペロン(molecular chaperone) (hsp70, hsp60等)、シグナルペプチダーゼ、シグナル認識タンパク質、E. R. への膜移行のトランスロケーションに同与する種々のタンパク質、E. R. の種々の酵素及び膜成分、ゴルジ(Golgi)、並びにまだ特徴が解明されていない分泌小胞及び多くのタンパク質が挙げられる(Franzoso *et al.*, A. M., 1991, 前出引用文献; Rothman, J. E. 及び Orci, L., 1992, *Nature*, 355, pp. 409-415; Gething, M. G. 及び Sambrook, G., 1992, *Nature*, 355, pp. 83-85)。このような複雑さに見て、単一の成分(即ちPDI)の量が増加するだけで特定の異種タンパク質の分泌が実質的に増加するという可能性は、当業者には極めて認識しにくいことと思われる。そこで本発明は、PDIの量が増加しただけで、例えばアンチスタチンのような分泌タンパク質の量が有意に見つ実質的に増加するという極めて意外な結果を顕示した。これは、タンパク質の折り畳

みに、本発明では別の認識宿主、例えば非特定の異種例として哺乳動物細胞、植物細胞、細菌のような原核生物の細胞、昆虫細胞、並びに酵母及び糸状菌類のような高等真核生物の細胞と使用し得る。また、これも当業者には明らかなように、酵母及びヒト細胞以外の細胞に由来するPDIコーディングDNAの使用も本発明の範囲内に包含される。PDIコーディングDNAの別の種類の非限定的具体例としては、ヒト以外の脊椎動物、例えばラット及びマウス、非脊椎動物、例えば昆虫、並びに高等真核生物、例えば菌類が挙げられる。

Rothblatt及びMeyerの方法(1986, *Cell*, 44, pp. 619-28)の方法でStreptococcusから調製したミクロソームフラクションは高レベルのタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)活性を有していたが、該レベルは培養処理によって8-20倍増加した。これは、脊椎動物の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Mills *et al.*, 1983, *Biochem. J.*, 213, pp. 245-8); Lambert及びFreedman, 1985, *Biochem. J.*, 228, pp. 835-45)及びユムギ

及びノ又はジスルフィド結合形成の促進に関連していると思われる現象である。

本発明は、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)をコードするDNAを過剰発現させることにより、認識宿主細胞による組織タンパク質の量を増加させる方法を提供する。本明細書中のPDIは、分子内及び分子間ジスルフィド結合の形成を特異的に触媒する酵素を意味する。

幾つかの種に由来するPDI遺伝子のDNA配列は当業界で知られている。これらの種の非限定的具体例としては、ヒト、ウシ、ラット、ニワトリ及び酵母が挙げられる。

(Mizunaga *et al.*, 1990, *J. Biochem.*, 108, pp. 846-851; Scheraga *et al.*, 1991, *Yeast*, 7, pp. 185-193)。

PDIをコードするDNAの組織における過剰発現は胚系の種類の細胞又は組織であってよく、非限定的具体例としては、哺乳動物及び他の脊椎動物の細胞及び組織、並びに高等真核生物の細胞及び組織が挙げられる。ここでは本発明者、組織文化酵母宿主細胞内で発現される酵母及びヒトPDIを用いて説明する。当業者には容易に理解されるよ

の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Rodon *et al.*, 1982, *FEBS Lett.*, 138, pp. 121-4)と類似の酵素が、酵母発酵の小胞体の内腔に存在することを示唆するものであった。高等真核生物酵素に対して構造的、PDIをコードする遺伝子をクローニングした。高度の保存を示す可能性が最も高い領域は、脊椎動物PDIにおいて高度に保存されており、特に二つの機能的ジチオール活性部位の領域でチオレドキシシンに対して極めて強い相関を示すα及びα'ドメインであると思われる。活性部位の共通配列はFYAGWCGHCCK(配列番号: 4)である(Parkkonen *et al.*, 1983, 前出引用文献)。本発明者30マーオリゴヌクレオチドを酵母コードンバイアス(bias)に基づいて設計し(Schaper, 1986, *Nucleic Acids Res.*, 14, pp. 5125-43)、これを示唆標識して、マルチコピーYEpプラスミドpMA30内で精製した酵母ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用した(Crouzet及びTuite, 1987, *Mol. Gen. Genet.*, 210, pp. 581-2)。スクリーンから二つの極めて稀世のクローン(C7及びC10と称する)が同

収され、予備制限地図を作成した結果、挿入体サイズはそれぞれ14 kb及び14, 8 kbであり、二つの挿入体は共通の制限部位をいくつか有することが判明した。クローニングの挿入物を更に分析した。

クローニングが確かにPDIをコードすることを確認するために、酵母 *S. cerevisiae* 株MD40/4c [ $\alpha$ -trp1 ura2 his3 leu2:Trp site<sub>1</sub>, 1986, E. M. B. O. J., 1, pp. 603-608] をクローニング及びプラスミドpMA36で形質転換した。800bp AG2分析の結果、C7形質転換株は、主として58 kDaポリペプチドを過剰発現し、おそらくは約77 kDaの第二のポリペプチドも過剰発現することが判明した(第1図)。また、二つの株の無制限溶解液をPDI活性についてアッセイしたところ、C7形質転換株は10倍のPDI活性レベル(38, 6 $\times$ 10<sup>4</sup> U/mgタンパク質)を示した。これら二つの事実は、活性部位配列WCGRCRK(配列番号: 8)を有する *S. cerevisiae* テオロドキシンは分子量が約12 kDaであるため(Porqueら, 1970, J. Biol. Chem., 243, pp. 2363-70)、C7クロー

ニングがPDIをコードし、テオロドキシンをコードしないという見方を裏付けるものであった。

既定上のPDIコーディング配列の位置を決定する(Locating)ために、C7クローニングを種々の制限酵素で消化し、消化産物をユトロセルロースポルトランスフェーシ、前述の80マーカー「活性部位」オリゴヌクレオチドでブローブした。この操作では、5 kbのBamHI-SalIフラグメントと、それぞれ5, 9及び4, 5 kbの二つの明らかに隣接しているHindIIIフラグメントとが同定された。後者のパターンは、活性部位のコピーを二つ含むPDIについて予測されるであろうように、「活性部位」ブローブの模様が二つ存在し得ることを示唆するものであった。二つのHindIII部位からの予備DNA配列分析では、酵母動物PDIに対して弱い相同性を示す断取り枠(ORF)の存在が明らかにされたが、これらは正確配列ではないため、他にもHindIII部位が存在するに違いないことも判明した。この推測は、詳細な制限地図の作成とDNA配列決定とによって確認された。元の制限部位とオリゴヌクレオチドプライマーとを用いて、二つの隣接HindIII部位を含む2, 6 kbのHind

III-SalIフラグメントの配列決定を両方の様で行った。

DNA配列は、予測された分子量89, 082の、530アミノ酸をもつポリペプチドをコードすることができる1593bpの唯一断取り枠の存在を予測させた(Farquhar, R., ら, 前出引用文献、第2図参照)。断取り枠は、通常に多いタンパク質をコードする酵母mRNAに典型的なコドンバイアスを有していた(Kennelzen及びHall, 1982, J. Biol. Chem., 257, pp. 3029-3031)。コドンバイアス指数(codon bias index)の計算値は0, 60であった。

決定されたヌクレオチド配列の分析は、多数の標準的断母プロモーター及びターミネーターモチーフを明らかにした(Farquhar, R., ら, 前出引用文献、第2図参照)。これらのモチーフは、断取り枠に対して-100と-128との間に位置する(TA)<sub>10</sub>配列の一部分としてのTAATAボックス様間部位と、位置-291と-238との間のポリミジンに富んだ領域(37ヌクレオチドのうち34)とを含む。断取り枠の3'末端には、TAA

断取りターミネーターに続いて、*S. cerevisiae* 内での転写終結及び又はポリアデニル化のシグナルと仮定される配列(Zaret及びSierman, 1982, Cell, 28, pp. 568-73)、並びに真核生物ポリアデニル化部位(Proudfoot及びBrownlee, 1976, Nature, 254, pp. 211-4)の両方に対する相同が存在する。

該クローニング遺伝子が転写されたかどうかを調べるために、断取り枠に対して内側の800bp HindIII-SalIフラグメントを用いて、二つの異なる炭素源、グルコース及びアセートで、異なる増殖サイクル段階まで増殖させた *S. cerevisiae* の二つの異なる株(MD40/4c及びSKQ2n [ $\alpha$ /ade1/ura2e2/+his1/+; Gasion6, 1979, J. Biol. Chem., 254, pp. 3865-3869]) から調製した全RNA試料のノーザンブロットをブローブした。指数増殖細胞では、グルコース及びアセート増殖細胞で単一の1, 8 kb転写体が検出されたが、非増殖細胞では転写体は殆ど検出できなかった。転写体のサイズは、mRNAの5'及び3'領域内の非翻訳配列の



約200ヌクレオチドを考慮に入れて、読取り誤りにより予測された通りであった。

予測されたアミノ酸配列は、下記の理由によって誤配列が正にPDIであることを強く示唆した：

(i) 予測された59kDaの分子量と、哺乳動物PDIに特異的なpI(4.1)とを有していた；

(ii) 該アミノ酸配列は、BESAFIソフトウェア(GWGC, Universality of Wisconsin)によって決定されたように、先に報告された哺乳動物及び鳥類のPDI配列に対して、90〜92%の全体的同一性と、58〜66%の全体的類似性を示した；

(iii) 該アミノ酸配列中の位置58〜65及び403〜410に「チオレドキシン様」活性部位の二つのコピーを含んでいた。また、これらの配列は、哺乳動物PDI内の重複a/a'領域に対して高度のアミノ酸同一性を示す約100アミノ酸のより大きい内部重複(internal duplication)の一部であった(第2図)。酵母及び哺乳動物PDI配列を並べると(a1igameti)、a及びa'領域の外側に、大きな相関を示す別の領域が存在することも明らかになった(第2図)。

G. F. ら、1981d, Nucleic Acids Res., 12, pp. 1049-1065]を有する1.8kbのBamHIフラグメントがPDI1コーディング配列内のEcoRV部位に挿入されている(第3図)ヌク(null)対立遺伝子を同定した。his3二倍体酵母S. cerevisiae株(A53324; [Spalding, A., 1988, Ph. D. Thesis, University of Kent])を、pdi1::HIS3破壊を有するDNAフラグメントで形質転換して、PDI1遺伝子の二つの失活性コピーのうちの一つを前記非機能性対立遺伝子で置換した。三つのHIS<sup>+</sup>A53324形質転換体(Y1、Y2及びY3)を更に調べた。いずれの場合も、二倍体の孢子形成は四分子当たり二つの生存可能孢子を生産しただけであり(第3図)、これらは総てhis<sup>+</sup>であった。この結果は、致死型変異がpdi1::HIS3突然変異に関連していたことを示すものである。正確な遺伝子置換がHIS<sup>+</sup>形質転換体Y1及びY2において生じたことは、800bpのHindIII-SalIフラグメントをプローブとして用いる、PstIで消化したブロットされた酵母ゲノムDNAへのザンハ

また、コードされたポリペプチドの別の二つの特徴は、これがS. cerevisiae小胞体の成分であることを示唆している。該タンパク質は、細胞上の分泌シグナルの特徴を有する著しく疎水性のN-末端配列をコードし(Gierbach, 1989, Biochemistry, 28, pp. 923-930)、四つのC末端アミノ酸は酵母DIPのそれと同じであり(Norningtonら、1989, Cell, 57, pp. 1223-26)、S. cerevisiaeの小胞体保持シグナルであると報告されている(Pelhamら、1988, EMBO J., 7, pp. 1757-62)。

本発明者は、クローニングS. cerevisiae PDI遺伝子をPDI1と命名した。このS. cerevisiae PDI1遺伝子はゲノム内のただ一つのコピーに存在する。これは、前述のG. 8kb HindIII-SalIフラグメントを種々のゲノム消化薬物に対するプローブとして用いる高電圧ハイブリダイゼーションにより確認された。

単一のPDI1遺伝子が生存能力にとって必須であるかどうかを調べるために、HIS3遺伝子[Montell,

ハイブリダイゼーションにより確認された。PDI1遺伝子は内部PstI部位を含まないが(第3図)、HIS3遺伝子は単一PstI部位を含むため(第3図)、これでgii::HIS3対立遺伝子は劇的に同定される者である。予測されたように、非形質転換A53324では単一の9kb PstIフラグメントが検出されたが、Y1及びY2形質転換体では9kb及び2.2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなると推測される9kbバンドと共に検出された。これらのデータは、二つの染色体のうち一方の染色体上のPDI1遺伝子がHIS3対立遺伝子で置換され、このような事象がハプロ致死であることを立証するものである。

酵母PDIをコードするDNAを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち任意のものを使用し得る。これらの方法の非限定的具体例としては、適当な発現ベクター系内でのPDI含有DNAライブラリーの構築に次ぎ、PDI遺伝子の直接的機能発現が挙げられる。別の方法は、バクテリオファーズ又はプラスミドシールドベクター内で構築したPDI含有DNAライブラリーを、PDIタンパク質のアミノ酸配列から設計した標的ペプチドオリゴヌクレオ

デブローブでスクリーニングすることからなる。好ましい方法は、プラスミドベクター内で融合したヒト又は酵母PDI含有ゲノムDNAライブラリーを、酵母細胞位の既知のアミノ酸配列をコードする推定DNAプロンプでスクリーニングすることからなる。

当業者には容易に理解されるように、別のタイプのライブラリー、及び別の細胞又は細胞タイプから構築したライブラリーもPDIをコードするDNAの単離に有用であり得る。別のタイプのライブラリーの非限定的具体例としては、酵母細胞以外の別のヒト、脊椎動物及び下等無脊椎動物細胞又は細胞系に由来するcDNA及びゲノムDNAライブラリーが挙げられる。

当業者には明らかなように、適当なライブラリーは、PDI活性を有する細胞又は細胞系から調製し得る。PDI-cDNAを単離するためのcDNAライブラリーの形成で使用するための細胞又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に細胞結合PDI活性を測定することにより実施し得る。

cDNAライブラリーの形成は当業者によく知られている標準的方法で実施できる。よく知られているcDNAラ

イブラリーを形成するためのcDNAライブラリーの形成で使用するための細胞又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に細胞結合PDI活性を測定することにより実施し得る。

本明細書では、発現ベクターは、遺伝子のクローニングコピーの転写と、mRNAの適切な宿主内での翻訳に必要なDNA配列であると定義される。この種のベクターは、細菌、真菌、植物細胞、酵母、昆虫細胞及び動物細胞のような種々の宿主内で異種生物遺伝子を発現させるのに使用し得る。

特異的に設計したベクターは、宿主間、例えば細菌-酵母又は細菌-動物細胞間のDNAのシャトリングを可能にする。通常に使用した発現ベクターは、宿主細胞内の自律的複製のための複製起点と、選択可能なマーカーと、遺伝子の有用な利用酵素部位と、高コピー数へのポテンシャルと、適切なプロモーターを含んでいる必要がある。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させRNA合成を開始させるDNA配列であると定義される。強力なプロモーターは、mRNAが高頻度でイニシエートされる

ライブラリー構築方法は、例えばManiatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982)に記載されている。

PDIをコードするDNAを適当なゲノムDNAライブラリーから単離し得ることも当業者には明らかである。

ゲノムDNAライブラリーの構築は当業者によく知られている標準的方法で実施できる。よく知られているゲノムDNAライブラリー構築方法は、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982)に記載されている。

前述の方法で得たクローニングPDIは、交換PDIを産生するために、適当なプロモーターと別の適当な転写調

節にするプロモーターである。発現ベクターの非限定的具体例としては、クローニングベクター、座落されたクローニングベクター、特異的に設計されたプラスミド又はウイルスが挙げられる。

哺乳動物細胞内で交換PDIを発現させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。交換PDI発現に適し得る市販の哺乳動物発現ベクターの非限定的具体例としては、pMC1neo (Serratene)、pXT1 (Serratene)、pSG6 (Serratene)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37593)、pSPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pDBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVsp1 (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCTag (ATCC 37460)及びpZD35 (ATCC 37565)が挙げられる。

PDIをコードするDNAはまた、細胞の組織又は宿主細胞内での発現のために発現ベクターにクローニングし得る。構築された細胞は原核生物、例えば非限定例として

細菌、又は真核生物、例えば非限定的具体例として酵母、哺乳動物細胞、例えば非限定的具体例としてヒト、マシ、ブタ、サル及び鳥類動物に由来する細胞系、並びに胚性細胞、例えば非限定的具体例として 210300p3h11a 由来細胞系、及び組換えバキューロウイルス発現系と共に使用される S. cerevisiae frugiperda (SF9) 昆虫細胞であってよい。適当なものとして使用し得る市販の哺乳動物細胞系細胞系は非限定的具体例としては、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-T (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C1271 (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26) 及び MRC-5 (ATCC CCL 171) が挙げられる。

酵母細胞プロモーターは酵母細胞内でのP.D.J.遺伝子の転写を開始させる。従って、当業者には容易に理解されるように、任意の酵母細胞プロモーター配列、例えば非限定的具体例として、GAL1、GAL10、GAL7、PG

K1、ADH1、ADH2、PGQ5及びGAP491

(TDH3) を利用し得る。また、組換え宿主内でのP.D.J.の発現をアッセイするために、適当なアッセイシステム、例えばイムノプロット又はR.I.Aもしくはエンザイムイムノアッセイ (EIA) を使用し得ることも当業者には明らかであろう。

S. cerevisiae は、増殖用炭素源としてのガラクトースの<sup>PR</sup>使用に関与している酵素をコードする遺伝子を三つ有している。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7及びGAL10はそれぞれ、ガラクトキナーゼ、ガラクトースペルメラーゼ、ホステグルコミターゼの置置アイソザイム、α-D-ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ及びウリジンホスホガラクトース-4-エピメラーゼをコードする。ガラクトースが存在しないと、これらの酵素の発現はほとんど検出されない。細胞をグルコースで増殖し、次いでガラクトースを培養液に加えると、これら8種類の酵素はRNA転写のレベルで、少なくとも1、000倍だけ (GAL5は例外であって、約50倍に誘導される) 誘導的に誘導される。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7及びGAL10遺伝子を分子

的にクローニングし配列決定した。それぞれのコーディング領域の5'側の開始及びプロモーター配列は、1aを遺伝子のコーディング領域に隣接して配置した。これらの実験で、ガラクトースの誘導に必要十分なプロモーター及び調節配列が決定された。

S. cerevisiae はまた、皆々がADHのアイソザイムをコードする三つの遺伝子を有する。これらの酵素のうちの一つであるADH1Iは、S. cerevisiae が酸化の増殖時にエタノールを炭素源として利用する能力に関与している。ADH1IアイソザイムをコードするADH2遺伝子の発現はグルコースにより異化代謝物抑制されるため、0.1% (w/v) のレベルのグルコースの存在下では発現の増殖時のADH2遺伝子の転写は実質的に得られない。グルコースが欠失しており且つ非抑制炭素源が存在すると、ADH2遺伝子の転写は100~1000倍誘導される。この遺伝子を分子的にクローニングして配列決定し、転写の抑制解除 (derepression) に必要十分な調節及びプロモーター配列を決定した。

アルファ嵌合因子 (alpha mating fac

tor) は、MATα細胞とMATe細胞との間の接合に必要とされるS. cerevisiae 性フェロモンである。このトリデカペプチドは、組換え細胞内に送られ、グリコシル化され、タンパク質分解的にプロセッシングされ、細胞から分泌される最終成熟形態となるプレプロフェロモンとして発現される。この生化学的経路は、外膜ポリペプチドの発現ストラテジーとして利用されてきた。アルファ嵌合因子遺伝子は分子的にクローニングされ、プレプロリーダー配列を有する該遺伝子のプロモーターは僅々のポリペプチドの発現及び分泌に利用されてきた。また、PHQ5遺伝子プロモーターは低濃度ホスフェートによって誘導し得ることが判明した。これは、酵母内での外膜タンパク質の生理学的に調節された発現にとっても有用である。

アルファ嵌合因子プロモーターは、表現型的に主である細胞内でのみ活性を示す。S. cerevisiae にはSIRとして知られている四つの遺伝子座があり、これらはα及びα<sup>+</sup>情報の通常サイレントの別のコピーの抑制に必要なタンパク質を合成する。この抑制現象を妨害する温度感受性 (ts) 誘育が、これらの遺伝子座のうち少なくとも一つの座の遺伝子座物内に存在する。この突然変異株で

は、35℃までの増殖が抑制を醸成し、その結果、アルファ融合因子プロモーターが不活性化である表現型にa/aの細胞が生じる。温度を35℃にシフトすると、細胞は表現型的にaに戻り、その結果プロモーターが活性化になる。レオ S. J. R 障害を有する株の発現は、幾つかの外來ポリペプチドの制御された発現について説明されてきた。

当業者には容易に理解されるように、PDIの発現のための適当な酵母株は広範囲の候補の中から選択される。適当な酵母株の非限定的具体例としては、プロチアーゼ失活及び強化したグリコシル化能力といったような遺伝子型的及び表現型的特徴を有するものが挙げられる。

Saccharomyces属は様々な種からなる。S. cerevisiaeは種々の外來ポリペプチドの転換えDNA仲介発現のための宿主として最も一般的に使用されている。しかしながら、Saccharomyces属の他の種の間の区別は必ずしも明確ではない。これらの種の多くはS. cerevisiaeと交雑することができ、S. cerevisiaeそのプロモーターと類似の又は同じプロモーターを有していると思われる。従って、当業者には容易に理解されるように、PDI発現のための宿主株

は、当業者には容易に理解されるように、PDI発現のための宿主の選択範囲は、Saccharomyces aceae科及びAscomycota科の別の酵母菌の種、例えば非限定的具体例としてCandida、Hansenula、Kluyveromyces、Pichia、Saccharomyces opsis及びTorulopsisにまで広がる。

発現ベクターは、多くの方法、例えば非限定的具体例として形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合及び電気穿孔液のうち任意の方法を用いて宿主細胞内に導入し得る。発現ベクター含有細胞はクローニングで増殖し、種々に分析して、PDIタンパク質を産生するかどうかを調べる。PDI発現宿主細胞クローニングの同定は、幾つかの方法、例えば非限定的具体例として抗PDI抗体に対する免疫学的反応性、及び宿主細胞結合PDI活性の存在によって実施し得る。

PDI-DNAの発現はまた、in vitroで産生した合成mRNAを用いて実施し得る。合成mRNAは種々の細胞システム、例えば非限定的具体例としてコムギ胚芽抽出物及び動物胎血球抽出物中で効率的に翻訳できる

の選択範囲は、Saccharomyces属の別の種、例えば非限定的具体例としてCandida、Hansenula、Pichia及びTorulopsisは、唯一の増殖用炭素源としてのメタノールの利用について類似の代謝経路を有することが判明した。この代謝経路に関与する酵素であるアルコールオキシゲナーゼの遺伝子はPichia pastorisから単離されている。P. pastorisアルコールオキシゲナーゼプロモーターは単離されて、発現のメタノール誘導に敏感であることが判明した。このような誘導可能プロモーターは、酵母内でのポリペプチド発現に有用である。特に、このプロモーターは、P. pastoris内での異種遺伝子の高効率な発現用のプラミッド上で使用であることが判明した。この観察は、別の酵母菌が簡便型のポリペプチドの転換えDNA仲介発現のための宿主として機能する可能性を強調するものである。

と共に、細胞ベースのシステム、例えば非限定的具体例としてカエル卵母細胞内へのマイクロインジェクションで効率的に翻訳できる。

当業者には容易に理解されるように、PDIは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組込まれた転換え発現カセットに由来する転換え宿主内で発現され得る。また、これも当業者には明らかであろうが、PDIは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで自律的複製プラスミド上に存在する転換え発現カセットに由来する転換え宿主内で発現され得る。

転換えPDIを発現する転換え宿主細胞は、別の転換え遺伝子の発現のための宿主として使用し得る。本発明の新規の方法は、転換えPDIを産生する宿主細胞内で、ジスルフィド結合をもつ転換えタンパク質をコードするDNAを発現させることにより、ジスルフィド結合をもつ転換えタンパク質の収率を実質的に増加させる。当業者には容易に理解されるように、本発明の方法ではジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質が産生され得る。ジスルフィド結合をもつタンパク質の非限定的具体例としては、分泌されるか又は細胞結合状態を保持するタンパク質が挙げられる。

ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の発現のための組換えDNA構築物は、PDIについて詳述した方法によって形成し得る。当業者には明らかなように、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組込まれた組換え発現カセットから発現され得る。また、これも当業者には明らかなであろうが、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、自溶細胞型プラスミド上に存在する組換え発現カセットから発現され得る。更に、これも当業者には容易に理解されることであるが、PDIをコードするDNA及びジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞当たり単一のコピー又は複数のコピーで、同一プラスミド上に存在し得る。ジスルフィド結合をもつ二つ以上のタンパク質が、組込まれたカセットもしくはプラスミド上のカセット、又はこれらの組合わせから同時発現され得ることも当業者には明らかなであろう。

組換え宿主細胞内でのPDIの発現後は、PDIタンパク質を回収して、タンパク質中のジスルフィド結合の形成

を触媒することができる活世型の精製PDIを改修し得る。PDI精製方法は種々存在し、説明に遅れている。突然変異に由来するPDIの精製について明述したように、組換えPDIは細胞溶解物及び抽出物、又はならし培養液から、塩分画、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト吸着クロマトグラフィー及び疎水的相互作用クロマトグラフィーを随々に組合わせて又は僅かに適用して精製し得る。

更に、組換えPDIは、PDIに特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体を用いて形成したイムノアフィニティカラムを用いて、別の細胞タンパク質から分離することができる。

PDIに対する単一特異性抗体を、PDIに対して反応性を示す抗体を含む固相動物抗体薄から精製するか、又はKöhler及びMilstein, *Nature* 259: 405-497 (1975)に記載の方法を用いて、PDIに対して反応性を示すモノクローナル抗体として製造する。本明細書中の単一特異性抗体は、PDIに対する均一結合特性を有する単一の抗体種又は複数の抗体種であると定義される。本明細書中の均一結合(homogenous

ous binding)という用語は、抗体種が特定の抗原又はエピトープ、例えば前述のようなPDIと結合する能力を有す。非特異的抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウナギ、ヤギ、ウマ等の動物、好ましくはウサギを、免疫アジュバントを用いて又は用いないで、適当な濃度のPDIで免疫感作することにより産生する。

最初の免疫感作の前には免疫前血清を回収する。許容し得る免疫アジュバントと組合わせたPDIを約0.1mg〜1000mgで各動物に投与する。許容し得る免疫アジュバントの非限定例として、フロインドの完全アジュバント、フロインドの不完全アジュバント、ミョウバン塩化物、Corynebacterium parvum及びIRNAを含む油中水エマルジョンが挙げられる。最初の免疫感作は、好ましくはフロインドの完全アジュバント中の酵素を、皮下(SC)、腹腔内(IP)又はその両方で複数の部位に注射することからなる。各動物から一定の時隔間隔、好ましくは一週間隔隔で採血して、抗体力価を測定する。動物には、最初の免疫感作後、ブースター注射をしてもしなくてもよい。ブースター注射をした動物には、通常、同様のフロインド完全アジュバント中酵素を同

一経路で与える。ブースター注射は、最大力価が得られるまで約2週間の間隔で行う。各ブースター感作から約2週間後、又は単一免疫感作の後で約1週間毎に動物から採血し、血清を回収し、アリコートをして20℃で貯蔵する。

近交系マウス、好ましくはBALB/cをPDIで免疫感作して、PDIと反応するモノクローナル抗体(mAb)を製造する。マウスは、前述のように、IP又はSC経路で、同量の許容し得るアジュバントに混入した約0.5mLの懸濁液又は生理食塩水中約0.1mg〜約10mg、好ましくは約1mgのPDIで免疫感作する。好ましくはフロインドの完全アジュバントを使用する。マウスは毎日最初の免疫感作を施し、約2〜約3週間隔にわたって休息させる。免疫感作したマウスには、リン酸緩衝生理食塩水のような緩衝液中約0.1〜約10mgのPDIの投与からなる一回以上のブースター免疫感作を、静脈注射(IV)によって施す。抗体陽性マウスに由来するリンパ球、好ましくは脾臓リンパ球を、当業者に公知の標準的方法で免疫マウスから脾臓を除去することによって得る。脾臓リンパ球と適当な融合相手、好ましくは骨髓瘤細胞とを、安定なハイブリドーマを形成させる条件下で混合して、

ハイブリドーマ細胞を製造する。融合相手の非限定的具存例としては、マウス骨髓腫P3/N31/A54-1; M P C-H1; S-194及びSp2/0が挙げられるが、好ましいのはSp2/0である。抗体産生細胞及び骨髓腫細胞を、約30%〜約50%の濃度で、約1000mOsmolのポリエチレングリコール中で融合させる。融合者は公知の方法で、ヒポネサンゲン、チミジン及びアミノプテリンを添加したダルベッコ改変イーグル培養液(DMEM)での増殖により、融合したハイブリドーマ細胞を選別する。約34、38及び42日目に関連陽性ウエルから上清液を回収し、PDIを抗原として用いる固相イムノアッセイ(SPIRA)のようなイムノアッセイによってスクリーニングし、抗体の産出を調べる。mAbのアイソタイプを調べるために、培養液をOuchterlony沈降アッセイでも検査する。抗体陽性ウエルからのハイブリドーマ細胞を、MacPhersonの抗原吸着技術(Soft Agar Techniques, Tissue Culture Methods and Applications, Krusee及びPetersen編、Academic Press, 1973)によりクローニン

製造するための前述の方法は、PDIポリペプチドフラグメント又は完全長さのPDIポリペプチドに特異的な抗体の産生に使用し得る。

抗体がアガロースゲルビーズ支持体との共有結合を形成するようにN-ヒドロキシスクシンイミドエステルで予備活性化したゲル支持体であるAyligsi-10(Biorad)に抗体を加えて、PDI抗体アフィニタムを形成する。抗体は、スパーカーームとのアミド結合を介してゲルに結合する。次いで、残りの活性化エステルを1M ユクノールアミンHCl (pH8)でクエンケする。カラムを水及び0.23M グリシンHCl (pH2.6)で順次洗浄して、非結合抗体又は外来タンパク質を除去する。次いでカラムをリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中で平衡化し、PDIを含む細胞培養上清又は細胞抽出物をゆっくりとカラムに通す。該カラムをリン酸緩衝生理食塩水で光学密度(A<sub>280</sub>)がバックグラウンドに近下するまで洗浄し、次いでタンパク質を0.23M グリシン-HCl (pH2.6)で溶離する。次いで、精製PDIタンパク質をリン酸緩衝生理食塩水に対して透析する。

グする。

初回抗原刺激(pri miting)から約4日後、ブリストン頭脳Seib/cマウスに、マウス当たり約0.5mLで、約2×10<sup>6</sup>〜約6×10<sup>6</sup>のハイブリドーマ細胞を注射することにより、モノクローナル抗体をin vivoで産生する。細胞のトランスファーから約8〜12日後に腹水を回収し、当業者に公知の方法でモノクローナル抗体を精製する。

約2%のウシ胎児血清を含むDMEM中でハイブリドーマを増殖させてin vitroのmAb産生を行い、十分な量の特異的mAbを得る。該mAbを当業者に公知の方法で精製する。

緩水又はハイブリドーマ培養液の試料液を、種々の血清学的又は免疫学的アッセイ、例えば非限定的具存例として、沈降法、受動凝集、ELISA (enzyme-linked immunosorbent antibody) 及びラジオイムノアッセイ(RIA)で測定する。細胞のアッセイを用いて、抗体又は細胞及び細胞抽出物中のPDIの存在を検出する。

当業者には容易に理解されるように、単一特異性抗体を

以下の実施例は本発明を説明するためのものであって、その範囲を限定するものではない。

#### 実施例 1

##### 株及び培養条件

Saccharomyces cerevisiae株 MD40/4C (MATa, leu2-3-112, ura2, his3-11, -16, trp1) 及び AS3324 (MATa/MATa<sup>+</sup> his3/his3, leu2/leu2, ura3/ura3, trp1/trp1) を、YE PD (1%バクトペプトン、1%酵母抽出物、2%グルコース) 又はpH6.8緩衝最少培養液(0.67%アミノ酸結合有酵母要素ベース、2%グルコース、1%コハク酸、0.6% NaOH、50μg/mlノゾイノシトール)に必要な塩基及びアミノ酸を加えたもので30°Cで増殖させた。

S. cerevisiae株 JRY188 (MATa, sur3-8, leu2-112, trp1, ura3-82, his418 rake, A. J. S. 1984, P roc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81,

pp. 4642-4846) 及び B J 1995 (M A T a, i c u 2, i r p 1, u r a 3-52, p r b 1-1122, p e n 4-3, k a i 2; Jones, E. W., 1991, Methods Enzymol., 194, p p. 428-453) を P D i 遺伝発現の評価に使用し、適当な実施例に記載のように増殖させた。

大腸菌 (*Escherichia coli*) 株 D H 5 α (s u p E 4 4 Δ l a c U 1 6 9 (φ 8 0 l a c Z Δ M 1 5) h s d R 1 7 r e c A 1 s e d A 2 g y r A 9 6 t h i 1 r e i A 1) をプラスミドスクリーニング操作に使用した。

## 実施例 2

### DNA操作

制限ヌクレアーゼ消化及びDNA連結を、酵素製造業者 (B C L, B R L) の指示に従って実施した。*S. c o i* i 形質転換の標準的プロトコル (C o h e n ら, 1972, P. N. A. S. U S A, 69, p p. 2110-9) 及び *S. c e r e v i s i a e* 形質転換の標準的プロトコル (B e g g s, 1978 N a t u r e, 275, p p.

6, 前出引用文献) を試した。

非組込みヌクレオチドから制限オリゴヌクレオチドを分離すべく D E - 5 2 クロマトグラフィーを使用して、制限ライブラリーをスクリーニングするために、制限オリゴヌクレオチド B o n g を [γ-<sup>32</sup>P] d A T P [A m e r s h a m, 3000 C i / m m o l,] 及び T 4 ポリヌクレオチドキナーゼで末端標識した。次のようなコロニーハイブリダイゼーションにより、約 20, 000 D H 5 α 超換コロニーをニトロセルロースフィルターでスクリーニングした: 各ニトロセルロースフィルターを、550 μl ムアミド、6×SSC、1×タンハート溶液、250 μg / m l 変性サケ精子DNA、0. 1% SDS 中で、37℃で18時間におたり予備ハイブリダイズした。標識オリゴヌクレオチド (比活性 4, 8×10<sup>7</sup> d p m / μg) を 0. 07℃で3分間変性し、次いで予備ハイブリダイゼーション緩衝液中で 2 μg / m l に希釈し、フィルターに加えた。37℃で更に10分間インキュベートした後、フィルターを洗浄し、4×SSC、0. 1% SDS 中で2分間洗った。該フィルターを一晩オートラジオグラフィにかけた。

39個の潜在的陽性コロニーが同定され、これらを前述

104-9: i i o ら, 1983, J. B a c t e r i o l., 133, p p. 163-8) を実施した。H o l m らの方法 (1983, C a n a, 42, p p. 169-73) で *S. c e r e v i s i a e* からゲノムDNAを製造した。

## 実施例 3

### P D i 1 遺伝子の発現

高コピー数 1 8 2 2 - d、2 ミクロンベクター p M A 3 a (C r o u z e i 及び T o i t e, 1987, 前出引用文献) の B a m H I 部位にクローニングした S. c e r e v i s i a e 株 S K Q 2 α / s a d e 1 / + s a d e 2 / t h i 1 s 1 / +: G a l 1 o n ら、前出引用文献) に由来するDNAの断片 3 4 0 3 A フラグメントを含む酵母ゲノムライブラリーを、P D i 1 遺伝子についてのスクリーニングに使用した。30 マーオリゴヌクレオチド (5'GTACACTGACACACCATGCAACGTACG3') (配列番号: 5) を、高濃度に保存されている「チオレドキレン族」塩基部位 (P V A P W C G H C K) (配列番号: 4) に対して、塩し解凍コドンバイアスを用いて (S h a r p ら, 198

のスクリーニングに更に2回かけると、その中で10個の陽性クローン (標識付き C 1 ~ C 10) が得られた。これらのクローンのうちの二つ (C 7 及び C 10) の制限地図を作成し、クローン C 7 を後述の研究のために選択した。

## 実施例 4

### DNA配列の解析

配列決定に適した大きさのフラグメントを同定するために、クローン C 7 を一連の制限酵素で消化し、1%アガロースゲル上でフラグメントを分離し、真空ブロッティング装置 (N y b a i d L t d.) を用いて G e n e s c r e e n P l u s マンブラン (D o p o n t) にトランスファーした。次いで、M a n i a t i s らの方法 (1982, 前出引用文献) に実質的に従ってフィルターを予備ハイブリダイズし、その後、前述のように末端標識した30 マーオリゴヌクレオチドプローブを加えた。ハイブリダイゼーションを 6×SSC 中 43℃で24時間実施し、次いで2回の洗浄を 200 m l の 2×SSC 中室温で5分間行い、更に2回の洗浄を 200 m l の 2×SSC、0. 1% SDS 中 57℃で1時間行い、最後に 500 m l の 0.

1×SSC中で室温で1回洗浄した。次いでフィルターを-70℃で48時間オートラジオグラフィーにかけた。

ジデオキシ核糖ヌクレオチド（Sangerら, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 3463-3477）を用いて、クロニンC7に由来する2.4 kbのSalI-EcoR Iフラグメントを完全に配列決定した。配列決定に用いた制限フラグメントを、Holmes及びQuigleyの電泳方法（1981, *Anal. Biochem.*, pp. 193-7）を用いて配列決定前に製造したプラスミドDNAとpUC19とにサブクローニングした。更に、幾つかのフラグメントを一本鎖ベクターmp12又はmp18にクローニングした（Messing, 1983, *Method Enzymol.*, 101, pp. 20-78）。一連の配列決定プライマー（15〜18マー）を合成した。これらのプライマーは、クローニングベクターのポリリンカー領域、又は予め決定した内部C7-DNA配列にアニーリングする。プライマーのアニーリングに完了後、プラスミドDNAを0.2M NaOH、20m EDTA中で37℃で30分間炭化し、0.1巻の3M酢酸ナトリウ

ムpR5, 0の表面によって中和し、3巻の25%エタノールで-70℃で15分間沈降させた。[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP (3000 Ci/mmol; ICN)を標識に使用して、in vitroの延伸を行うために、T7-DNAポリメラーゼ（Sequences, US Biochemicals）を製造業者の指示通りに施用した。反応を既に記述されている方法で解析した（Bossierら, 1989, *Gene*, 78, pp. 323-30）。

#### 実施例 5

##### RNAの製造及び解析

株MD40/4cの指数増殖細胞（ $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/ml）又は正常細胞（ $2 \times 10^6$ 細胞/ml）から完全RNAを製造した。30分間の熱衝撃（30℃〜42℃）にかけたMD40/4cの指数増殖細胞からもRNAを抽出した。完全RNAは、本質的にDobsonらの方法（1980, *Nucleic Acids Res.*, 11, 2287-2302）に従って抽出した。

ノーザンブロット解析を次のように実施した：20  $\mu$ gの完全RNAを20%ホルムアルデヒド、50%酸イオン

ホルムアミド中で55℃で15分間加熱することにより炭化し、次いで3%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル中で分離した。該RNAを真空ブロッティングでニトロセルロースフィルター（S&S, BA85）にトランスファーし、該フィルターを10mM トリス-昇C中で5分間煮沸した。ハイブリダイゼーションを、10×デンハート溶液、2×SSC、50mMリン酸緩衝液pH6.5、40%ホルムアミド、0.1%SDS、400  $\mu$ g/ml熱変性サケ精平DNA及び1〜5 ng/mlのプロンプ中で42℃で一晩実施した。フィルターを-70℃で1〜5日間オートラジオグラフィーにかけた。検出されたプローブは、PvuII遺伝子に由来する0.8 kbのHindIII-SalIフラグメント（Farquhar, 氏ら, 前出引用文献、第2図参照）、並びにpBR322にクローニングしたS. cerevisiaeの18S及び26SリボソームRNA遺伝子の一部分を含むプラスミドScp7（Dr. R. S. Cox, University of Oxfordから入手）である。これらのプローブは、ランダムプライマー増殖（BCL）で製造業者の指示に従って標識した。

#### 実施例 6

##### odil::HIS3対立遺伝子の誘導

HIS3遺伝子を有する1.8 kbのBamHIフラグメントをプラスミドpMA700から放出させ（Montielら, 1984, 前出引用文献）、1%低融点アガロース（Sigma）上で精製した。該フラグメントのBamHI付着末端を、Maniatisらの方法（1982, 前出引用文献）で、dNTPsとDNAポリメラーゼIのクレンジングフラグメントとを用いて炭化した。次いでPvuII遺伝子の1.2 kb PvuII-BglIII Iフラグメントを、プラスミドpUC19のポリリンカー内のSmaI-BamHI部位にサブクローニングした。炭化に、HIS3遺伝子を含む元来したBamHIフラグメントを、PvuIIコーディング領域内の単一のEcoRV部位に遷移した（第3図）。得られたodil::HIS3対立遺伝子を3.0 kbのSalI-EcoR Iフラグメント上に遷移させ、低融点アガロース上で精製し、11.0巻の酢酸リチウム形態転換プロトコル（1983, 前出引用文献）を用いて二倍体株AS3324をHis<sup>+</sup>プロトタイプ



(property) に影響を及ぼすのに使用した。

#### 実施例 7

##### in vitro の PDI アッセイ

全タンパク質抽出物における PDI 活性のアッセイを、Hill 等の方法 (1984, Methods Enzymol., 107, pp. 281-92) で実施した。

##### 試薬の調製

スクランブルリボヌクレアーゼ (scramble RNAase) は、ランダムに形成されたジスルフィド結合を含む完全に酸化した混合物である。これは、市販の (Sigma) ワンステップリボヌクレアーゼ A から下記の方法で調製する。

リボヌクレアーゼを、50 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 8.6、8、9 M 尿素、100 mM ジチオトレイトール (還元可能ジスルフィド結合に対して約 1.5 倍モル過剰なジチオトレイトール) 中 80 mg/ml (約 2.2 mM) で、室温で 18 時間〜20 時間、又は 55℃ で 1 時間イン

kubade x G-25 から遊離することにより、スクランブル混合物を回収する。タンパク質含有フラクションをブールし、1 M トリスで pH 8 に調整し、4℃ で貯蔵する。

この方法によるスクランブルリボヌクレアーゼの収率は通常 90〜100% である。該混合物は溶液中 4℃ で 6 ヶ月まで安定であり、あるいは、50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、pH 7.8 中に透析し、次いで凍結乾燥して、-20℃ で無菌瓶に貯蔵し得る白色粉末状固体物質としてもよい。

##### アッセイの手順

試薬、スクランブルリボヌクレアーゼは、約 2% の天然リボヌクレアーゼ活性を有する高分子量 RNA の加水分解開裂では本質的に不活性である。スクランブルリボヌクレアーゼ中の分子間及び分子内ジスルフィドの交換の阻害における PDI の作用は、天然ジスルフィド結合、天然形態を回復させ、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を随時的に回復させる (concomitant reactivation)。このようにして、PDI の活性を、抽出中にアリコートが採取されるタイムコース (time-course) インキュベーションによってアッセイし、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を測定する。

反応混合物を水酢酸で pH 4 に酸性化し、その直後に、蒸ガスしたり、1 M 酢酸で Sephadex G-25 カラムから遊離することにより、還元タンパク質を分離する。280 nm で溶解フラクションをモニタリングし、タンパク質含有フラクションをブールし、天然リボヌクレアーゼを標準として用いて、タンパク質濃度を分光光学的に又は化学的に測定する。

還元リボヌクレアーゼの試料を 0.1 M 酢酸で約 0.5 mg/ml に希釈する。固相試薬を最終濃度 10 mM まで加え、塩酸サルコシンを 0.1 M まで加える (サルコシンは濃厚尿素溶液中に存在するシアネートイオンと反応させるために加えられ、カルバミル化によってリボヌクレアーゼを不活性化し得る)。1 M トリスで pH を 8.5 に調整し、等所室温で 2〜3 時間インキュベートする。その間にタンパク質は大量  $\text{O}_2$  によってランダムに再酸化される。このインキュベーションの後で、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を用いて還元チオール基を調べると、再酸化が完了していることが判明する (リボヌクレアーゼ分当あたり 0.1 以下の還元チオール)。

水酢酸で pH 4 に酸性化し、0.1 M 酢酸中で Sep

タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼの試料を、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5 に、最終量が 900  $\mu\text{L}$  になるまで加え、10<sup>-6</sup> M ジチオトレイトール (10  $\mu\text{L}$  の 1 mM ストック溶液、毎日新しく調製) と共に 30℃ で 2〜8 時間予温インキュベートする。トリス-HCl 緩衝液も使用し得るが、その場合は活性が約 25% 低下する。次いでアッセイを、スクランブルリボヌクレアーゼの 100  $\mu\text{L}$  アリコート (10 mM 酢酸中 0.5 mg/ml ストック溶液、毎日新しく調製) の添加により開始し、インキュベーション混合物を 30℃ に維持する。より小さい規模で操作する場合は、前記の量を 1/10 に減少して、最終アッセイ量を 100  $\mu\text{L}$  とし得る。10  $\mu\text{L}$  アリコートを 0.5 分の時点で採取し、その後 2〜3 分間隔で 18 分まで採取して、スクランブルリボヌクレアーゼの再活性化についてアッセイする。各アリコートは、30℃ で予め平衡化した石英管キャベット内で、0.25 mg の高圧に重合した酵母 RNA (80  $\mu\text{L}$  の 5 mg/ml ストック溶液) を含む 30  $\mu\text{L}$  の TBM 緩衝液 (50 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 7.5、2.5 mM  $\text{KCl}$ 、5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) のアッセイ混合物に等量に加える。Perk

ion-Biore 356分光光度計（バンド幅2.5nm）のデュアル波長モードを用いてリボヌクレアーゼ活性を30℃でモニターし、 $A_{260}$ （ $\Delta A$ ）に対する $A_{280}$ の変化を測定する。RNA加水分解速度（ $\Delta A$ 分<sup>-1</sup>）は1.5～2分にあたって一定である。この速度に対してインキュベーションからのアッセイの採取時間をプロットしたグラフは、15分まで直線である。時間推移（time course）の結直線部分の勾配（ $\Delta A$ 分<sup>-1</sup>分<sup>-1</sup>）を三つ組みアッセイの線形回帰分析で計算し（相関係数は決まって0.99である）、クンバク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の測定値とする。

シチオトシトールのみによるスクランブルリボヌクレアーゼの非酵素的再活性化の速度を測定するために、酵素試料を省略して対照インキュベーションを測定する。これらの速度は通常 $0.2 \times 10^{-1} \Delta A$ 分<sup>-1</sup>分<sup>-1</sup>であり、酵素試料のクンバク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の計算で差し引かれる。

1単位のクンバク質ジスルフィドイソメラーゼ活性は、1リボヌクレアーゼ単位/分の速度でスクランブルリボヌクレアーゼの再活性化を触媒する量であると定義される。

#### 実施例 8

酵母LYS2又はURA3座にAD1複製カセットを組み込むためのベクターの構築

LYS2での組み込みのためのベクターを下記の手順で構築した。プラスミドpUC19をHindIIIで消化し、線形ベクターフラグメントをゲル精製した。次いでこのフラグメントをEcoRIで消化し、得られた2.7kbpのEcoRI-HindIIIベクターフラグメントをゲル精製した。精製フラグメントを下記の合成オリゴヌクレオチドと連結した：

5'-AATTGCGCGCCGCAAGGTTCGCGCCGC-3'（配列番号：6）

3'-CGCCGCGCGTTCGCAACGCGCGCGTCCA-5'（配列番号：7）

該オリゴヌクレオチドは、EcoRI付着末端と、NotI部位と、HindIII部位と、NotI部位と、HindIII付着末端とをこの順序で含む。得られたプラスミドpUC-NotIは、両端でNotI部位に直接フランキンゲされた単一のHindIII部位を含む。

URA3座に組み込むべき複製カセットのターゲッティングのためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母HURA3遺伝子源は、YEp19に由来する1.1kbpのH

1リボヌクレアーゼ単位は、1吸収（adsorbance）単位/分の $A_{260}$ に対する $A_{280}$ の変化を生起する量であると定義される。

ind1IIフラグメントであった[Parent, S. A.ら, 1985, Yeast, 1, pp. 82-188]。プラスミドpUC-NotIをHindIIIで消化し、チウシ塩アルカリホスファターゼで脱リン酸化し、1.1kbpのHindIII-EcoRIフラグメントと連結して、プラスミドpUC-NotI-URA3を得た。

LYS2座への複製カセットの組み込みをターゲッティングするためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母LYS2遺伝子を有するプラスミドYEp699[Barneas, D. A. 及びTheriot, J., 1986, Mol. Cell. Biol., 6, pp. 2828-2838]をEcoRI及びHindIIIで消化し、LYS2遺伝子を有する4.5kbpのEcoRI-HindIIIフラグメントを、予めEcoRI及びHindIIIで消化したpUC19にクローニングした。次いでこのプラスミドをPvuII及びBglIIで消化し、LYS2遺伝子を有する3.7kbpのPvuII-BglIIフラグメントをゲル精製し、平末端酸化した。プラスミドpUC-NotIをHindIIIで消化し、チウシ塩アルカリホスファターゼで脱リン酸化し、平末端酸化し、3.7

KbpのLYS2フラグメントと連結した。所期の構造を有する得られたプラスミドをpUC-N<sub>co</sub>I-LYS2 (pNLとも称する)で調製した。

LYS2での組込みのための第二のベクターも構築した。プラスミドY1p600をNcoIで消化し、LYS2タンパク質コーディング配列の大部分を含む3.0kbpのNcoIフラグメントをゲル精製し、平滑 (*smooth*) 末端化した。プラスミドpUC13をBamHIで消化し、平滑末端化し、3.0kbpのLYS2フラグメントと連結して、組込みベクターpUC13-LYS2を得た。

#### 実施例 9

酵母アルファ因子分泌リーダに融合したヒトPDIを過剰発生する酵母株の構築

ヒトPDIコーディング配列源は、Pihlajaniemiら (1987, 前出引用文献) によって記載されている重複部分的cDNAクローン、p210及びp1であった。ヒトPDI cDNAの5'末端を有するp210に由来する0.45kbpのEcoRI-PstIフラグメントをpUC13にクローニングして、プラスミドpUK

C150を得た。次いで該プラスミドpUKC150をEcoRI及びXbaIで消化した (XbaIは成熟ヒトPDIをコードする配列の第三のアミノ酸に対応する位置で切断する)。得られた3.1kbpのベクター断片 (*backbone*) フラグメントをゲル精製し、下記の構造のオリゴヌクレオチドアダプターと連結した:

5'-GAATTCCTGACGCGC-3' (配列番号: 8)

3'-GCACCTCCGCGCGCT-5' (配列番号: 9)

該アダプターは成熟PDIコーディング配列の5'末端を再構築し、示置の分泌リーダ配列への成熟ヒトPDI配列の正確な融合を可能にするような位置にHindIII部位を含む。

次いで、得られたプラスミドpUKC150をPstIで消化し、予知シ順アルカリホスファターゼで処理し、ヒトPDIコーディング配列の残部を有するプラスミドpI (Pihlajaniemiら, 1987, 前出参考文献) に由来する1.5kbpのPstI-PstIフラグメントに連結して、プラスミドpUKC160を得た。このプラスミドpUKC160をHindIII (副記オリゴアダプター内で切断する) で消化し、次いでHindIIIで

消化した。その結果得られた、成熟ヒトPDIコーディング配列を有する1.9kbpのHindIII-HindIIIフラグメントをゲル精製し、予めSacI及びHindIIIで消化したプラスミドpGS4にサブクローニングした (pGS4はアルファ分泌因子 (前記例1) プレプロ分泌リーダ配列に融合した酵母GAL1プロモーターを有する: Shaw, K. J. ら, 1988, DNA, 117-126)。平滑末端化SacI及びHindIII末端の間に形成された融合部は、GAL1プレプロリーダ配列とヒトPDI成熟部分との間の正確なインフレーム融合を再構築する (得られたプラスミドはpUKC161と命名した (第4図))。

LYS2組込みベクターpNL (pUC-N<sub>co</sub>I-LYS2) をSacI及びXbaIで消化し、T4 DNAポリメラーゼでの処理によって平滑末端化した。プラスミドpUKC161をEcoRI及びHindIIIで消化し、その結果得られた、GAL1プロモーター - アルファ因子プレプロリーダ - ヒトPDI発現カセットを有する2.8kbpのEcoRI-HindIIIフラグメントをゲル精製し、T4 DNAポリメラーゼでの処理

によって平滑末端化した。前記平滑末端pNLベクターフラグメントと該発現カセットフラグメントとを互いに連結し、快速融合物を用いてEcoRI株ATCC 35591を形質転換した。所期の構造を有するプラスミドを含むものについて形質転換体をスクリーニングし、得られたプラスミドpNL-MP $\alpha$ I-hPDIを多量に製造した。pNL-MP $\alpha$ I-hPDIをNcoIで消化すると、両端でLYS2-DNA配列にフランキングされた、2kbpの発現カセットが得られる。消化したDNAを用いて、スフェロプラスト法で (Hinnen A. ら, 1978, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 75, pp. 1929-1938), SacI株BY1995及びIRV188を形質転換した。NcoI末端はターゲッティングデバイスとして作用しながら発現カセットを染色体LYS2座に同化させ、該座で副記カセットが相同置換を介して組込まれた。形質転換体を、アルファアミノグロビン検査遺伝子座で増殖するものについてスクリーニングした (Chasello, B. B. ら, 1979, Genetics, 91, pp. 51; Barnes及びThornear, 1986, 前出





メントが両面が両面で挿入されたプラスミドpUC- $\gamma$ SP-hPDI (HDEL) 及びpUC-hSP-hPDI (HDEL) を得た。これら二つのプラスミドをBamHIで消化し、発現カセットを有する二つの異なる1.5 kbのBamHIフラグメントをゲル精製し、次いでp401のBamHI部位に挿入して、それぞれpUC-GAL10p- $\gamma$ SP-hPDI (HDEL) 及びpUC-GAL10p-hSP-hPDI (HDEL) を得た。これら二つのプラスミドをSmaI、SphI及びPvuIIで消化した。得られた二つの2.5 kbのSmaI-SphIフラグメントをゲル精製し、平末端端化し、次いで、予めXbaIで消化しておいたpUC13-LYS2と連結し、平末端端化した。得られた二つのプラスミドpLYS2- $\gamma$ SP-hPDI (HDEL) 及びpLYS2-hSP-hPDI (HDEL) をHpaI及びEcoRVでの消化によって線形化し、次いで制限の反応で株BJ1995及びJRY188の形質転換に使用した。LYS2形質転換体を、アルファアミノアジピン酸含有媒体で選択した。LYS2座に組み込まれた両方の発現カセットを含む菌株を、ゲノムDNAのサザンブロット分析によって

EcoRVフラグメントの両方と連結してプラスミドpUC-MF $\alpha$ 1-hPDI (HDEL) を得た。該プラスミドをBamHIで消化し、PDIカセットを有する1.7 kbのBamHI-BamHIフラグメントをゲル精製し、プラスミドp401 (第6図) のBamHI部位に挿入して、プラスミドpGAL-MF $\alpha$ 1-hPDI (HDEL) を得た。次いで該プラスミドを酵素SmaI、SphI及びPvuIIで消化し、その結果得られた、発現カセットを有する2.6 kbのSmaI-SphIフラグメントをゲル精製し、平末端端化した。pUC13-LYS2ベクターをXbaIで消化し、平末端端化し、次いで前述の2.6 kbの平末端端化フラグメントに連結した。得られたプラスミドpLYS2-MF $\alpha$ 1-hPDI (HDEL) をHpaI及びEcoRVで消化し、次いで株JRY188及びBJ1995の形質転換に使用した。得られた形質転換体を (実施例9に記載のように) ゲノムDNAのサザンブロットで筛选し、所望の発現カセットがLYS2座に組み込まれていることを確認した。JRY188形質転換体を株#1279と命名した。

#### 実施例 13

同定した。得られた株を、BJ1995/ $\gamma$ SP-hPDI (HDEL)、BJ1995/hSP-hPDI (HDEL)、JRY188/ $\gamma$ SP-hPDI (HDEL) (株#1268) 及びJRY188/hSP-hPDI (HDEL) (株#1267) と命名した。

#### 実施例 12

酵母アルファ因子分泌リーダーを用いるヒトPDIのC末端HDEL発現カセットを過剰発現する酵母株の構築

プラスミドpUK161 (第4図) をBamHI及びClaIで消化し、アルファ因子プロモーター配列とhPDIの5'-セグメントとを有する0.7 kbのBamHI-ClaIフラグメントをゲル精製した。プラスミドpUC- $\gamma$ SP-hPDI (HDEL) (実施例11に記載) をClaI及びEcoRVで消化し、C末端HDEL改変を有するhPDIの3'セグメントを含む1.0 kbのClaI-EcoRVフラグメントをゲル精製した。pUC19をBamHI及びEcoRVで消化し、得られたベクターフラグメントを、0.7 kbのBamHI-ClaIフラグメント及び1.0 kbのClaI-

LYS2座の組み込み発現カセットから酵母PDIタンパク質を過剰発現する酵母株の構築

完全酵母PDI1遺伝子を有するプラスミドC7 (実施例4に記載) をEcoRVで消化し、酵母PDI断片 (ORF) のC末端部分 (アミノ酸223からORFの末端まで) と3'非翻訳配列とを含む1.8 kbのEcoRV-EcoRVフラグメントをゲル精製し、プラスミドpAT153 (Twigg, A. G. 及びShercatt, D., 1980, Nature, 283, pp. 218-218) のEcoRV部位に挿入して、pUK169を得た。次いでプラスミドC7をBamHI及びEcoRVで消化し、酵母PDI ORFのアミノ酸6-222をコードする0.67 kbのBamHI-EcoRVフラグメントをゲル精製し、下記の合成オリゴヌクレオチドフラグメントと連結した。

5'-GATCCGCAAGCAAAATGAGTTTTCGCTG-3' (配列番号:16)

3'-GTGTTTGTGTTTACATCAAGACGACAC-5' (配列番号:17)

該オリゴヌクレオチドフラグメントはそれぞれBamHI及びBamHI付着末端を有し、酵母PDI ORFのアミノ酸1-5と12塩基対の酵母5'非翻訳リーダー配列を

コードする。(ATG開始コドンはずねで示されている)。得られた0.7 kbの BamHI - EcoRVフラグメントをゲル精製し、次いで、予め EcoRV及び BamHIで消化しておいたpAT153にサブクローニングして、プラスミドpUKC170を得た。

プラスミドpUKC169を EcoRVで消化し、その結果得られた、酵母PDIの前記C末端部分を有する1.3 kbの EcoRV - EcoRVフラグメントをゲル精製し、次いでpUKC170の糸状体 EcoRV部位に挿入し、それによって無害の(完全な)酵母PDI (yPDI) 遺伝子を再産した。このようにして得たプラスミドをpUKC175と命名した。

pUKC175を EcoNIで消化し、yPDI遺伝子を有する得られた2.1 kbのフラグメントを平末端端化し、ゲル精製した。pUC19を SacI及び SmaIで消化し、平末端端化し、同記平末端端化 EcoNI - yPDIフラグメントと連結した。選択的形質転換を用いて E. coli DH5細胞を形質転換し、得られた形質転換体を、pUC19ポリリンカー内の BamHI部位がyPDIコーディング配列の3'末端に隣接して配置されるよう

HindIII - LYS2フラグメントを含む)の糸状体 SacI部位にクローニングした。得られたpUKC171-GAL10p-yPDIベクターを EcoR及び PvuIIで消化して LYS2-GAL10p-yPDI-ADH1(-LYS2カセットを切除し、これを用いて SacRV及び SacRV188及びRV199を形質転換した。得られた lys<sup>-</sup>形質転換体を、実施例9に記載のように、ゲノムDNA複製物のサザンブロットにより評価した。LYS2座に組み込まれた GAL10p-yPDIカセットを有する菌株の平末端が検出された。得られた株をB11995/yPDI及びB1988/yPDI(株#1152)と命名した。

#### 実施例 14

URA3座への形質転換カセットから酵母PDIを選択産出する酵母株の構築

プラスミドpUC1-NotI-URA3(実施例8)を PaeI及び NcoIで消化し(URA3遺伝子の一部分を欠失させるため)、平末端端化した。プラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADH1を EcoR、

に適切な方向でyPDI挿入体を有するプラスミドを含むものについてスクリーニングした。EcoNIフラグメント上のyPDI - ORFの3'末端には BamHI部位が既に存在していたため、成膜素物(pUC19-yPDIと命名)はこの時点で、1.9 kbの BamHIフラグメント上にyPDI - ORFを含む。pUC19-yPDIを BamHIで消化し、yPDI遺伝子を有する1.9 BamHI - kbのフラグメントをゲル精製し、次いでベクターpUC18-GAL10p(B)ADH1:(ストック#401)(第6図)の BamHI部位にサブクローニングした。得られたプラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADH1を SmaI、SacII及び SacIIで消化し、形質転換カセットを有する2.7 kbの SmaI - SacIIフラグメントをゲル精製し、平末端端化し、次いでpUKC171(pUKC171は、予め EcoR及び HindIIIで消化しておいたpUC19にサブクローニングしたY1p600(Barnes及びTurner, 1986, 前出引用文献)の4.5 kb EcoR -

SacI及び SacIIで消化し、GAL10p-yPDI-ADH1:形質転換カセットを有する2.8 kbの EcoR - SacIIフラグメントをゲル精製し、平末端端化し、前記ベクターフラグメントと連結して、プラスミドpNU-GAL10p-yPDIを得た。NotIでの消化により、pNU-GAL10p-yPDIからURA3-GAL10p-yPDI-ADH1-URA3組込みカセットを切り出した。得られた線形フラグメントを用いて酵母株KHY107を形質転換した。5-フルオロ-オロ酸含有固体培地上で(Boekeら, 1984, Mol. Gen. Genet., 197, pp. 346)、ura<sup>-</sup>形質転換体を選択した。得られたura<sup>-</sup>形質転換体由来するゲノムDNAを EcoIIIで消化し、GAL10p-yPDI-ADH1カセット由来の放射線標識した EcoR - PvuIIフラグメントをプローブとして用いて、サザンブロットにより評価した。形質のGAL10p-yPDI-ADH1:形質転換カセットを URA3に組み込んだ菌株が同定された。菌株K-Y1は、URA3に組み込まれた複製のコピーを有していた(株#1136)。菌株K-Y2は、URA3に組み込まれたコピーを一つだけ

育していた（株#1137）。

#### 実施例 15

##### 組織培養管内のPDIタンパク質量の評価

酵母株を、3×YEPD液体培地で、23℃で24時間増殖させた。24時間が経過した後、培養物にガラクトースを最終濃度4.8%まで加えた。次いで培養物を23℃で更に24時間再インキュベートした。あるいは、酵母株を3×YEPDで30℃で24時間培養した。細胞を回収し、無菌冷水で洗浄し、同量の3×YEPD-ガラクトース培地に再懸濁させた。酵母液を更に16〜28時間インキュベートし、その後回収し、タンパク質を抽出方法2（下記）で抽出した。

##### タンパク質の抽出：

本質的にMerrifieldの方法（1988, Gene, 24, pp. 1〜14）に従い、ガラスビーズ破壊法を用いて、指数増殖細胞又は定常期細胞からタンパク質を抽出した。

**方法1：**250mMリン酸緩衝液pH7.0中のPMSE（0.5mM）の存在下で細胞壁のガラスビーズ破壊を

トリルアミドゲル及びレーン当たり10μgのローディングされたタンパク質（タンパク質抽出方法1）。後のゲル中でSigma平偏染色分子重量標準を使用した。ゲルはBioRad mini-Protein IIゲルシステムで操作した。タンパク質濃度を計算せずに、細胞外抽出物をレーン当たり15〜20μlでローディングした。電気泳動の間中、電圧は200ボルト以下に維持した。

Bio-metra半乾膜ウエスタンブロットシステムを用いて、タンパク質をニトロセルロースにトランスファーした。ニトロセルロース膜を5%（w/v）粉乳で1時間ブロックし、洗浄し、1:500〜1:750の希釈度で8時間から一夜にわたって、抗ヒトPDIポリクローナル抗体と共にインキュベートした。膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgGを最終希釈度1:100で加え、インキュベーションを1時間続けた。洗浄後、Amersham ECLキットを製造業者の指示通りに使用して、ブロットを染色した。

最初のアッセイでは、株1072Aが分泌したPDIをウエスタンブロットで検出できるレベルで産生することが示明した。使用したECLブロットでは、検出レベルは0.

行い、次いで凍結-融解サイクルにかけてタンパク質を抽出し、13,000rpmで10分間の遠心分離により可溶性タンパク質を回収した。PEG（固体）、硫酸アンモニウム（0〜80%）又は限外濾過膜（<100kDa）での濃縮の前又は後で、濃縮培養液の成分により最初に分離を評価した。タンパク質濃度はBradfordの方法（1976, Anal. Biochem., 72, pp. 248〜254）で測定した。

**方法2：**方法1に従って、但し培養培地にNaOH及びターメルカプトエタノールを（それぞれ最終濃度0.2M及び1%で）加え、氷上に約10分間放置し、その後TCAを最終濃度8%で加えて、細胞内試料を調製した。氷上で30分間静置した後、遠心分離によってタンパク質を回収し、冷アセトンで洗浄し、SDS-PAGEローディング緩衝液に再懸濁させた。

50μgの全可溶性タンパク質を、本質的にSchulzの方法（1987, Gene, 54, pp. 119〜23）に従って、一次元SDS-PAGE（12%ポリアクリルアミド）とターマシーブルー染色とで分析した。

次の条件で電気泳動を実施した：10%SDS-ポリア

0.5μgの精製ワシPDIであった。この分泌PDIは、100kDaカットオフ限外濾過膜によって保持されたため、二量体であることが判明した。株1072Aと対応するHDEL変異株（1279）とを比較すると、ヒトPDIは両方から分泌されていた。この実験では、最終濃度/誘導条件を、増殖温度（℃）及び誘導期間について最適化した。両細胞株は、23℃で培養し次いで30℃で18時間誘導するか、又は30℃で18時間培養し誘導すると、より高いPDI合成レベルを示した。

#### 実施例 16

##### 酵母内でアンチスタチンを発現させるためのベクターの調製

アンチスタチンは血液凝固因子Xaの強力なタンパク質阻害物質である。アンチスタチン（ATS）は、メキシコヒルHaementeria o'f'f'icinalisの唾液腺から単離された（Nucci, B.ら, 1988, J. Biol. Chem., 263, pp. 10162〜10167）。その後、ATSをコードするcDNAがHan, J. H.らにより単離され、特徴が解明された（1989,



(配列番号: 19)

Gene, 15, pp. 47-57)。ATSは、超換え酵母によって分泌された異種タンパク質中の折り畳み及び最適なジスルフィド結合の形成に対する高レベルのPDI増強の影響を評価する上で選択的なリポータータンパク質である。なぜならATSは、タンパク質が生物学的活性を有するようにするために正確な対を形成しなければならない10個のジスルフィド結合を有するからである。

発現ベクターpKH4α2 (Jacobson, M., A., 1989, Gene, 85, pp. 511-516)を用いて、酵母内でATSを発現させた。前記ベクターは、ガラクトース誘導性GAL10プロモーターと、異種タンパク質の分泌を制御するための酵母MPα1プロモーターリーダー配列とを含む。ATSをコードする配列は、クローン番号C-6 (Hopp, J., B., 1989, 前出引用文献)に由来するサブクローニングしたATS cDNAを基質として使用し且つ下記のアリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法で単離した。

1. 3'-ATATGGATCGTGTCTTTGGATAAAGACAGGCGCATTTGGACCGCGTGT-3' (配列番号: 18)
2. 5'-TGTACGATCGCTTATGATTAAGGATGGGATTAAGCTT-3'

表1

| 形質転換株 | 宿主株   | 元の株    | PDI <sup>+</sup> カセット |
|-------|-------|--------|-----------------------|
| 990   | 239   | JRY100 | なし                    |
| 1105  | 2072A | JRY100 | アルファ-hPDI             |
| 1176  | 1157  | JRY100 | ySP-hPDI              |
| 1275  | 1108  | JRY100 | hSP-hPDI              |
| 1293  | 1279  | JRY100 | α2pha-hPDI(HDEL)      |
| 1294  | 1207  | JRY100 | hSP-hPDI(HDEL)        |
| 1295  | 1268  | JRY100 | ySP-hPDI(HDEL)        |
| 1477  | 1252  | JRY100 | yPDI                  |
| 1506  | 540   | SEY107 | なし                    |
| 1554  | 1136  | SEY107 | yPDI-A1               |
| 1555  | 1137  | SEY107 | yPDI-A3               |

+ PDIカセット及び株は次のように実施例に記載されている: アルファ-hPDI、実施例9: ySP-hPDI及びhSP-hPDI、実施例10: hSP-hPDI (HDEL)及びySP-hPDI (HDEL)、実施例11: アルファ-hPDI (HDEL)、実施例12: yPDI、実施例13: yPDI-A1及びyPDI-A2、実施例14。

\* 形質転換株はK991アンチスタシンの発現ベクターを含む。

これらのプライマーは両方とも、PCR産物のサブクローニングを容易にするためにBamHI部位を含む。第一のプライマーは、酵母KEX2 yscFニンドプロテアーゼ切断部位(Lys-Arg)N末端を、成熟ATSの第一アミノ酸残基に挿入する(酵母ysecFニンドプロテアーゼは該配列中のLys-Arg部位のC末端側で切断する)。PCR産物をBamHIで消化し、ゲル精製し、次いでBamHIで消化pKH4α2に連結して、pKH4α2/ATS (K991) (第8図)を得た。次いでこの発現ベクターを用いて、スフェロプラスト法(Hinnenら, 1978, 前出引用文献)で、表1に示す酵母宿主株を形質転換した。

ロイシンを含まない合成媒体増殖(Schultz, L., 1987, Gene, 61, pp. 123-183)上で形質転換株を選択し、クローン単離株についてストリークし、これらの単離株を連続的分析で使用した。株は、1%グリセロール含有合成増殖中で-70℃で貯蔵することにより保存した。

実施例 17

#### アンチスタシンの分泌に関する株及びPDI増強効果の増強及び誘導

K991形質転換株JRY188株と、酵母もしくはヒトPDIを過剰産生する種々の形質転換株とを、下記の方法でアンチスタシンの分泌に関して評価した。指示された株を-70℃冷凍グリセロールストックからロイシン無含有合成媒体プレート上にストリークし、30℃で2日間増殖させた。5mLの3xYEMD [60g Difco酵母抽出物、30g Hysopaペプトン、48g グルコース/l]培養液を入れた培養管(18x150mm)に小ループサイズの細胞を接種し、短時間増殖ロータリウム上で28℃で約18時間インキュベートした。この段階で、ガラクトースを最終濃度4.8% (w/v)で加えて細胞を誘導し、培養物を28℃で更に5日間インキュベートした。次いで、遠心分離で細胞を回収し、清液化培地上清をアンチスタシン活性のアッセイのために保持し、誘導性を因子Xa活性の阻害によって測定した(Nutall, S., 1988, 前出引用文献)。該実験は三つ組で実施した。結果を要約して表2に示す。

表2

| 株                 | ng ATB/L. 1.00 | 相対レベル |
|-------------------|----------------|-------|
| JRY188            | 25.6           | 1.0   |
| JRY188/hSP-hPDI   | 24.4           | 0.95  |
| JRY188/ySP-hPDI   | 28.4           | 1.11  |
| JRY188/alpha-hPDI | 27.2           | 1.0   |
| JRY188/yPDI       | 65.1           | 2.54  |

実施例 1.8

JRY188及びHDBL突然変異体形ヒトPDIを過剰発現する菌株によるアンチスチン分泌の評価

K991形質転換JRY188と、三つの異なる分泌リーダーを有するHDBL突然変異体形ヒトPDIを過剰発現する形質転換菌株とを実施例1.7に記載のように増殖し、清澄化培地上清を、実施例1.7に記載のように因子Xa感受アッセイで分泌ATBレベルについて評価した。結果は表3に示す。

表3

| 株         | ATB(ng/L) | AGP  | ATB/AGP |
|-----------|-----------|------|---------|
| KRY107 A1 | 2.314     | 23.9 | 0.093   |
| KRY107 A2 | 0.144     | 24.5 | 0.010   |
| KRY107 A3 | 0.334     | 25.5 | 0.013   |
| K-Y1 A1   | 1.106     | 24.8 | 0.047   |
| K-Y1 A2   | 1.469     | 21.8 | 0.067   |
| K-Y1 A3   | 1.493     | 23.3 | 0.059   |
| K-Y3 A1   | 3.856     | 39.0 | 0.099   |
| K-Y3 A2   | 2.144     | 31.2 | 0.064   |
| K-Y3 A3   | 1.929     | 40.0 | 0.040   |

K-Y1は、URA3に多重コピ- GAL-Y PDIを有するKRY107である。

K-Y3は、URA3には一コピ- GAL-Y PDIを有するKRY107である。

表3

| 株                       | ng ATB/L. 1.00 | 相対レベル |
|-------------------------|----------------|-------|
| JRY188                  | 18.0           | 1.0   |
| JRY188/hSP-hPDI(MDEL)   | 27.5           | 1.53  |
| JRY188/ySP-hPDI(MDEL)   | 29.3           | 1.63  |
| JRY188/alpha-hPDI(MDEL) | 21.3           | 1.75  |

実施例 1.9

酵母株KRY107及び酵母PDIを過剰発現する菌株によるアンチスチンの分泌

K991形質転換KRY107と、酵母PDIを過剰発現する菌株の形質転換菌株とを増殖し、清澄化培地上清を、実施例1.7に記載のように因子Xa感受アッセイで分泌ATBレベルについて評価した。結果は表4に要約して示す。

A1、A2及びA3は、平行して評価した指示された株の種々のクローン単体を示す。

酵母PDIの過剰発現の結果、菌株はK-Y3-A1の場合は、ATB活性の分泌が細胞当たりベースで4倍に増加し、空機ベースで約9倍の分泌が観察される。

実施例 2.0

多重コピ-プラスミドから酵母PDI又はヒトPDIを過剰発現する酵母菌株の構築

多重コピ-酵母セントロベクターYEp24 (Boris Ieina, D. G., 1979, Gene, 8, pp. 17-24) は、酵母2ミクロンDNA複製起点と、ウラシル無含有合成培地で選択するための酵母URA3遺伝子を含む。YEp24をBamHIで消化し、得られた7.8 kbpのBamHIベクターフラグメントをゲル精製した(フラグメントa)。プラスミドpUC18-GAL10p-YPDI-ADHI( (#1015) をEcoRI、SphI及びScaIで消化した。その結果得られた、GAL10p-YPDI-ADHIに発現カセットを有する2.8 kbpのEcoRI-SphIフラグメントをゲル精製した(フラグメントb)。プラスミドpUC161

をEcoRI及びHindIIIで消化し、GAL10p—MFA11 プレプロモーターPD1 発現カセットを有する2.8 kbpのEcoRI—HindIII フラグメントをゲル精製した(フラグメントc)。前記三つのフラグメントを平末端端化し、次いで下記の示順で互いに連結した:(1)ベクターフラグメントa及びフラグメントbを互いに連結してプラスミドYEp24-GAL10p-YPD1(第8図)を得る:(2)ベクターフラグメントa及びフラグメントcを互いに連結してプラスミドYEp24-GAL10p-MFA1-PD1(第10図)を得る。得られた前記二つのプラスミドDNAの大規模CaccI製造を行った。二つの前記の形質転換反応で、酵母株RY188をA<sub>1</sub>S発現ベクターK993(実施例10)及びYEp24-GAL10p-YPD1もしくはYEp24-GAL10p-MFA1-PD1で同時形質転換した。両方のプラスミドを含む形質転換体を、ロイシン及びウラシルの両方を欠失した合成培地で選択し、単離した単離株(singlet clone)を同一培地で再ストリークしてクローン単離株を選択した。二つの元の同時形質転換の各々について5個の前記クローン単離株を、培養管内の

5 mlの3 x Y2H培地に接種し、組織培養ローラードラムで23℃で24時間インキュベートした。24時間が経過した後、ガラクトースを最終濃度4.8%で加え、培養物を23℃で更に5日間インキュベートした。適当分離によって細胞を回収し、消滅化培地上清を因子Xa阻害アッセイでA<sub>1</sub>S活性レベルについてアッセイした。YEp24-GAL10p-YPD1プラスミド及びA<sub>1</sub>S発現ベクターを含む同時形質転換体は、A<sub>1</sub>S発現ベクターのみを含む株RY188株と比べると、単離体に対して3〜20倍の分画A<sub>1</sub>S活性レベルを示した。YEp24-GAL10p-MFA1-PD1プラスミドとA<sub>1</sub>S発現ベクターとを含む同時形質転換体は、A<sub>1</sub>S発現ベクターのみを含む株RY188株と比べて、2〜3倍の分画A<sub>1</sub>S活性レベルを示した。

### 実施例 21

前述の発現テンプレート発現に使用した同一発現ベクターから酵母又はヒト細胞を過剰産生する酵母宿主株の構築及び評価

S. cerevisiae GAL1及びGAL10 漢

出子を、分岐型(divergent) GAL1及びGAL10 プロモーターとこれら二つのプロモーターのTATAボックスの間に位置する共通GAL4結合ドメインとを含む二つの構造遺伝子の間の領域から分岐的に(divergently)転写した。プラスミドpBM272 (Johnson, M. 及びDavis, R., 1984, Mol. Cell. Biol., 4, pp. 1440)は、この分岐型酵母GAL1—GAL10 プロモーターを、85 kbpのEcoRI—HindIII フラグメントとを含む(HindIII 部位に挿入した内部BamHI 部位も有する)。このプロモーターフラグメントを使用して、分岐型プロモーターカセットベクターpUC-GAL1/10を構築した。該ベクターは次の特性を有する: 非反復EcoRI 及びBamHI 部位により、この順序で、酵母ADHI1転写ターミネーター(0.35 kbp HindIII—BamHI フラグメント)から分離した酵母GAL10 プロモーター。非反復BamHI 及びHindIII 部位によりADHI1転写ターミネーターの第二のコピーから分離した酵母GAL1 プロモーター。二つのADHI1ターミネーターエレメントの3'末端は、分岐型プロモーター

発現カセット全体をSphIフラグメントとして単離できるように、SphI 部位によってフランキンクされている。このプラスミド内のベクター三核は、ポリリンカーの代わりに別発現カセットを有するpUC18である。

プラスミドpUC-GAL1/10をBamHIで消化し、ゲル精製してフラグメント「a」を形成した。プラスミドpUKC161をBamHIで消化し、成熟ヒトPD1コーディング配列にインフレーム融合したアルファ因子プレプロリーダーを有する1.9 kbpのBamHI フラグメントをゲル精製し、ベクターフラグメントaに連結して、プラスミドpUC-GAL1/10-hPD1を得た。該プラスミドでは、アルファ因子プレプロ-hPD1融合がGAL1プロモーターの制御下にある。プラスミドpUC18-GAL10p-YPD1-ADHI1(実施例13)をBamHIで消化し、その結果得られた、酵母PD1コーディング配列を有する1.7 kbpのBamHI フラグメントをゲル精製し、次いでベクターフラグメントaに連結して、プラスミドpUC-GAL1/10-YPD1を得た。該プラスミドでは、GAL1プロモーターが酵母PD1の発現を制御する。このようにして得た二つのプ

ラスミドをEcoRIで消化し、平末端端化し、それぞれhPDI及びyPDIカセットを有するベクターフラグメントb及びcを得た。

ATS発現ベクター(K991)をSmaI及びBglIIで消化し、成熱ATSのコーディング配列にインフレーム融合したアルファ因子プロセグラーを有するSmaI-BglIIフラグメントをゲル精製し、平末端端化し、別個の反応で二つの平末端端化ベクターフラグメントb及びcに連結した。制限地図で調べて正確な挿入を有する得られたプラスミドを、それぞれpUC-GAL1/10-yPDI/ATS(第11図)及びpUC-GAL1/10-yPDI/ATS(第12図)で消化した。これから二つのプラスミドをSphIで消化して発現カセットを遊離させ、hPDI関連又はyPDI関連発現カセットを有するフラグメントを、予めSphIで消化した酵母シャトルベクターpC1/1(Rosenberg, S. R., 1984, Nature, 312, pp. 77-80)と連結した。その結果、二つのプラスミド、pC1/1-GAL1/10-hPDI/ATS及びpC1/1-GAL1/10-yPDI/ATSが得られた。これらのプラス

ミドでは、ATS及びPDI関連発現カセットが、それぞれGAL10及びGAL1プロモーターの制御下で同一の高コピー数ベクター上に存在していた。

次いでこれら二つの発現ベクターを用いて、酵母株JRY188、BJ1995及び他の適当な酵母宿主株を形質転換した。形質転換体をロイシン無含有培地上で選択し、得られた形質転換体を、上記実施例に記載のように、ATS及びPDIの発現/分泌について評価した。

表5(下記)に示す結果から明かなように、hPDIを過剰産生する菌株は、pKH4#2/ATSのみを含む対照株と比べて数倍高いレベルのアンチスタチンを分泌する。また、酵母PDIを過剰産生する菌株は、対照株と比べて3~17倍高いレベルのアンチスタチンを分泌した。

表5

| 菌株株                           | アンチスタチン (ng/L)* |
|-------------------------------|-----------------|
| <u>pC1/1-GAL1/10-hPDI/ATS</u> |                 |
| 菌株株 1                         | 4.2             |
| 菌株株 2                         | 5.3             |
| 菌株株 3                         | 3.9             |
| 菌株株 4                         | 4.6             |
| 菌株株 5                         | 5.1             |
| <u>pC1/1-GAL1/10-yPDI/ATS</u> |                 |
| 菌株株 1                         | 3.9             |
| 菌株株 2                         | 11.7            |
| 菌株株 3                         | 3.8             |
| <u>対照株</u>                    |                 |
| 菌株株 4                         | 26.0            |
| 菌株株 5                         | 8.2             |
| JRY188 対照                     | 1.5             |

\* 23℃で培養後5日目の収量。

実施例 2.2

#### PDI過剰産生酵母宿主株によるアンチスタチン分泌の増加に対する温度の影響

アンチスタチン発現ベクターpKH4#2/ATS及びYEP24-GAL1p-MFα-hPDIもしくはYEP24-GAL10p-yPDIで同時形質転換した株JRY188の導出した菌株体を、23℃又は30℃での増殖後にアンチスタチン分泌について評価した。アンチスタチン発現ベクターのみで形質転換した菌株JRY188を平行して増殖した。3xYEPHD培地で23℃又は30℃で一晩増殖した後、ガラクトースを最終濃度4.8%で加えて細胞培養物を誘導し、23℃又は30℃の適当な温度で更に5日増殖した。誘導後3~5日で採取した培養液を、因子Xa阻害アッセイにより分泌アンチスタチンレベルについて評価した。表6の結果から明かなように、アンチスタチン発現は、PDIを過剰発現する全ての菌株体について、誘導後3日目及び5日目の両方で、温度を30℃にした時よりも23℃にした時の方が遙かに大きかった。

表6

| 細胞株       | 温度<br>(°C) | アンチスタチン(ng/ml) |       |
|-----------|------------|----------------|-------|
|           |            | 2日目            | 5日目   |
| hPDI-1    | 23         | 0.63           | 2.11  |
| hPDI-2    | 23         | 1.34           | 2.68  |
| yPDI-1    | 23         | 5.93           | 10.25 |
| yPDI-3    | 23         | 3.00           | 15.92 |
| JRY189 対照 | 23         | 0.38           | 0.65  |
| hPDI-1    | 30         | 0.49           | 0.47  |
| hPDI-2    | 30         | 0.42           | 0.47  |
| yPDI-1    | 30         | 2.29           | 4.65  |
| yPDI-3    | 30         | 2.72           | 2.56  |
| JRY189 対照 | 30         | 0.34           | 0.30  |

\* 種々のhPDI細胞株は、アンチスタチン発現ベクターKH99I及びYEp24-GAL1p-MFα-hPDIの両方を含んでいた。yPDI細胞株は、ベクターKH99I及びYEp24-GAL10p-hPDIの両方を含んでいた。

TAPをコードする合成遺伝子にインフレーション融合した真正(authentic)MFα1プレプロ分泌リーダ配列を含む第二のTAP発現ベクターpKH4-35/TAPを構築した。合成TAP遺伝子を含むプラスミドpKH4-TAP(Neepersら, 1990, 前出引用文献)を、合成TAP遺伝子の5'末端及び3'末端をそれぞれ改良するために、下記の二つのオリゴヌクレオチドプライマー

5'-TACAGCCGEC TGTGCATCAAG-3' (配列番号: 20) 及び

5'-ACTGGATCCG AATTCAGCT TAGATGCAAG CGT-3' (配列番号: 21)

を用いるポリヌクレオチド合成法(PCR)で、DNA断片として使用した。

該PCR反応は、当業者によく知られている方法(Jones, M. A. ら編, 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, CA)で実施した。得られたPCR産物をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、BamHIで消化し、次いでゲル精製して、TAP

PDIを過剰発現する超換元酵母株によるマダニ抗凝血ペプチド(TAP)の分泌

マダニ抗凝血ペプチド(TAP)は、血液凝固因子Xaの強力な高選択性阻害物質である(Waxman, L. ら, 1990, Science, 248, pp. 593-596)。TAPはマダニOroyitihidofa mou baitsから単離された新規のセリンプロテアーゼ阻害物質である。TAPは、6個のシステイン残基を含む90個のアミノ酸からなる(Waxmanら, 1990, 前出引用文献)。TAPは、ガラクトース特異性GAL10プロモーターと、TAPをコードする合成遺伝子にインフレーション融合した酵母MFα1プレプロ分泌リーダ配列とを含む発現ベクターpKH4-TAPを用いて、酵母内で発現された(Neepers, M. ら, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 17746-17752)。このベクターは、プレプロリーダのアミノ酸79の位置に配置されたBamHIクロモニング部位の存在に起因して、少し改良されたMFα1プレプロリーダ配列を含む(Neepersら, 1990, 前出引用文献)。

APコーディング配列の直後5'末端に平末端を有し、かつ翻訳終結コドンの3'側に付着BamHI末端を有する、0.2kbのプラントBamHIフラグメントを得た。

ベクターpKH4-35(Hofmann, K. 及びSchultz, L. D., 1991, Gene, 101, pp. 103-111)は、MFα1プレプロリーダコーディング配列の3'末端に反対相SphI部位を含む。pKH4-35をSphIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで処理して平末端化し、BglIIで消化した。得られたプラントBglIIベクターフラグメントをゲル精製し、前述の0.2kbプラント-BamHI-TAPフラグメントに連結して、ベクターpKH4-35/TAPを得た。

別個の形質転換反応で、酵母株BJ1995、JRY288及びURIを、ベクターYEp24-GAL10p-hPDI及びpKH4-TAPもしくはpKH4-35/TAPで同時形質転換した。両方のプラスミドを含む同時形質転換株を、ロイシン及びワラシルの両方を欠失した合成培地上で選択し、単離した単葉産を同一培地上で再ストリ

ークして、クローム単離体を選択した。種々のベクターノ  
 容量同時形質転換の各々について三つの前記クローム単離  
 体を、培養管内の3 mlの4%グルコース含有ウラシル欠  
 失改質 $\text{xleu}^+$ 菌地( $\text{xleu}^+\text{Ura}^-$ )に接種し  
 た。接種菌物を組織培養ローラードラム内で30℃で24  
 時間インキュベートした。24時間が経過した後、細胞を  
 遠心分離によって回収し、4%ガラクトースを含む5 ml  
 の $\text{xleu}^+\text{Ura}^+$ 菌地に最終菌させた。得られた培養  
 物を30℃で更に48時間インキュベートした。次いで細胞  
 を遠心分離によって回収し、増強化増地試料をSCE-  
 HPLC又は因子X8非毒アッセイにより分泌TAPレベ  
 ルについて評価した(Waxmanら、1990、所引引  
 用文献)。別の方法として、増強化酵母細胞を23℃で2  
 4時間増殖し、ガラクトースを最終濃度4%で加えること  
 により誘導し、次いで23℃で更に5日間インキュベート  
 した。次いで、増強化増地試料を前述のように分泌TAP  
 レベルについて評価した。

配列番号: 3

配列の長さ: 6 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```
Trp Cys Gly Pro Cys Lys
1          5
```

配列番号: 4

配列の長さ: 10 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```
Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys
1          5          10
```

配列番号: 5

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 6 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```
Trp Cys Gly His Cys Lys
1          5
```

配列番号: 2

配列の長さ: 4 アミノ酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

```
His Asp Glu Leu
1
```

配列の長さ: 30 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

```
GTACAGTGA CCACACCATG GAGCGTAGAA
30
```

配列番号: 6

配列の長さ: 26 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

```
AAATGCGGCG GCAAGCTTGC GGGCGC
26
```

配列番号: 7

配列の長さ: 26 塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

16GTGGGGCC GCAAGCTTGC GGTGGC 28

配列番号：3

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

ATTTCCTTGA GGGCC 15

配列番号：9

配列の長さ：15塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

TGGGGGGCT GGGGGGGAC GAGGGGGAG GAGGGGGAG AGAGGAGAG GGGGGGGAG 40  
AGTGGTGGT GTG 73

配列番号：12

配列の長さ：88塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

GATGAGAA AGAAGTGA GTTTCCTT GGGGGGGC TATCATGTC GTGGTGGTC 60  
GAGGGGGT GAGTGGGC GAGGGGGC 88

配列番号：13

配列の長さ：88塩基対

配列の型：核酸

配列の種類：c D N A

配列

TGGGGGGCT GAGGC 15

配列番号：10

配列の長さ：73塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

GATGAGAA AGAAGTGA GGGGGGGT GTTTCCTT TGGGGGGC GAGGGGGC 60  
GGGGGGAG GGC 73

配列番号：11

配列の長さ：73塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

TGGGGGGCT GGGGAAAC AGAGGGGG AGAGGGGG AGAGGGGG GAGGGGGG 60  
GAGGAGAA AGTGGTGT GTTTCCTT 80

配列番号：14

配列の長さ：91塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列

GAGGGGGT AGAGGGGG AGAGGGGG GAGGGGGC GAGGGGGC GAGGGGGC 60  
AGAGGGGG AGAGGGGG GAGGGGGC 91

配列番号：15

配列の長さ: 95塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

AATTGGGATG CTATGAGTTC ATGCTGACG CATTGCTGCT CATGCTGCTTC  
CTGGGATGCT GCTCTGCTGCTG CTCTGCTGAG GTGCTGAGAG TGGTC

90

95

配列番号: 18

配列の長さ: 81塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

GATCCACAAA ACAAAATGAA GTTTTCGCT G

31

配列番号: 17

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

TATAGGATCC TTATGATAAG CGTGGGATAA GCTT

34

配列番号: 20

配列の長さ: 20塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

TTCACCGCTC TGTGATCAE

20

配列番号: 21

配列の長さ: 33塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 31塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

GCACCAAGCAG AAAACTTCAT TTCTTTTGT G

31

配列番号: 18

配列の長さ: 51塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

AAATGGAATG TGTCTTCTGA TAAAGAGAA GAGGATTTG GACCGGGTG G

51

配列番号: 19

配列の長さ: 24塩基対

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

CTGGGATCCG AATTCAAGCT TGGATGCAAG CGT

31



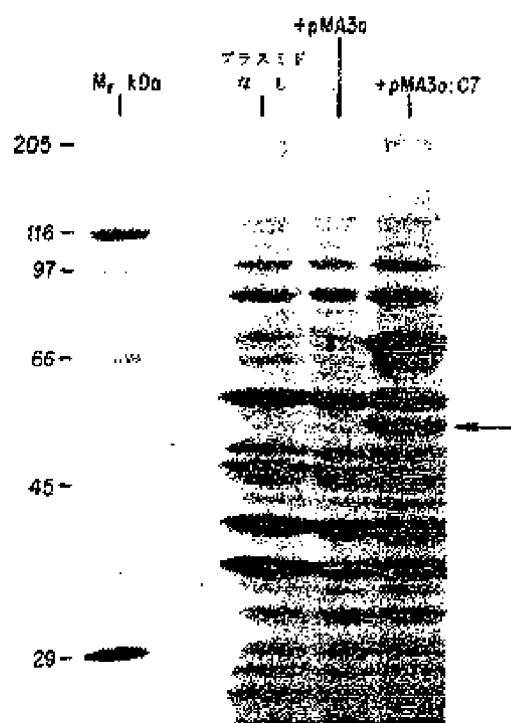


FIG. 1

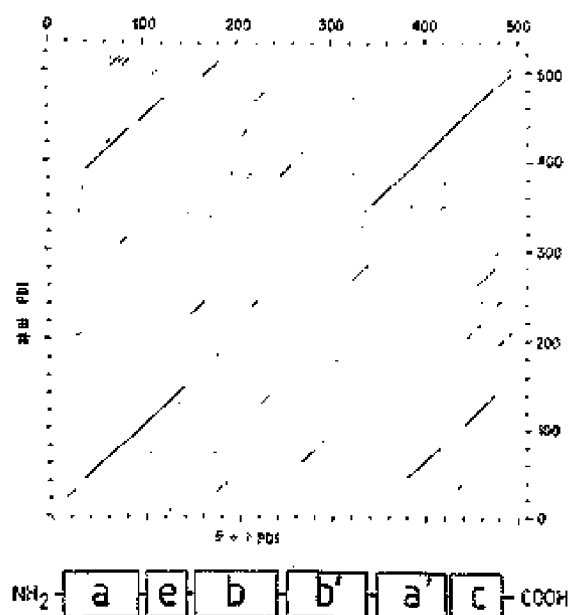


FIG. 2

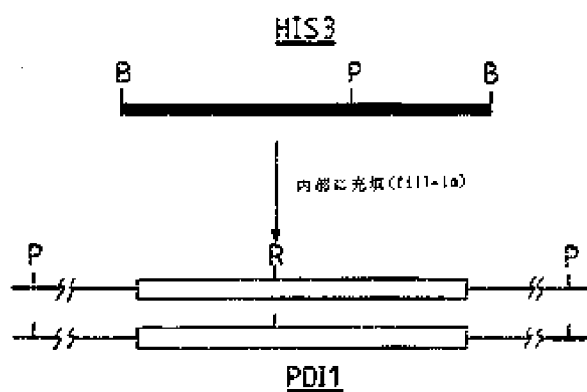


FIG. 3a



FIG. 3b

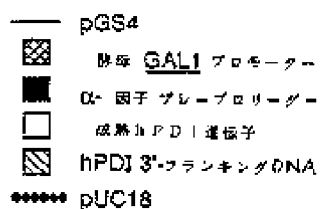
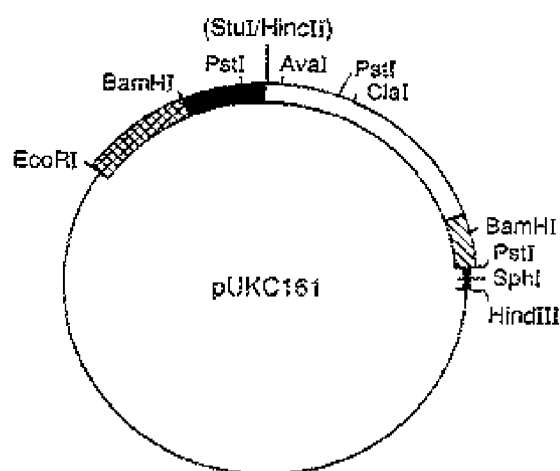


FIG. 4

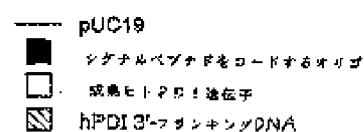
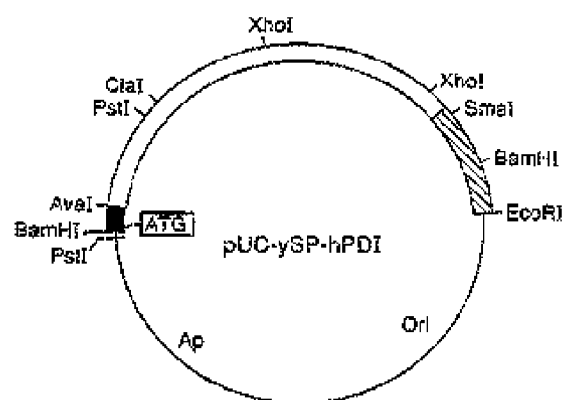


FIG. 5

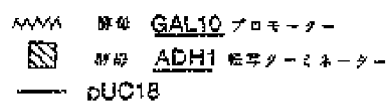
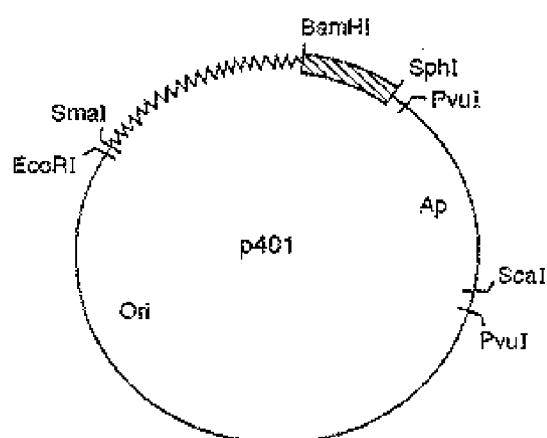


FIG. 6

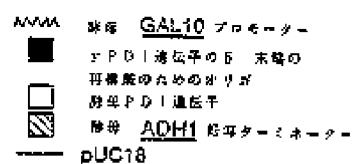
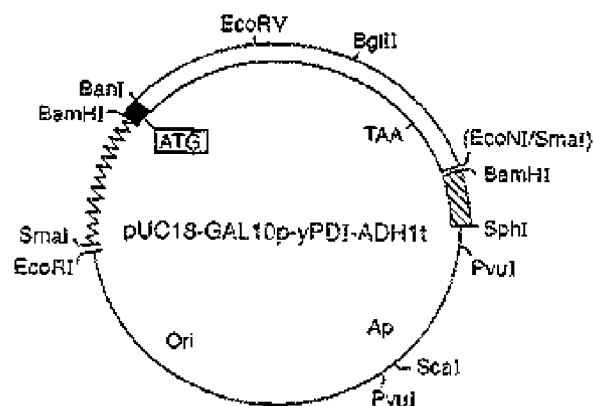


FIG. 7

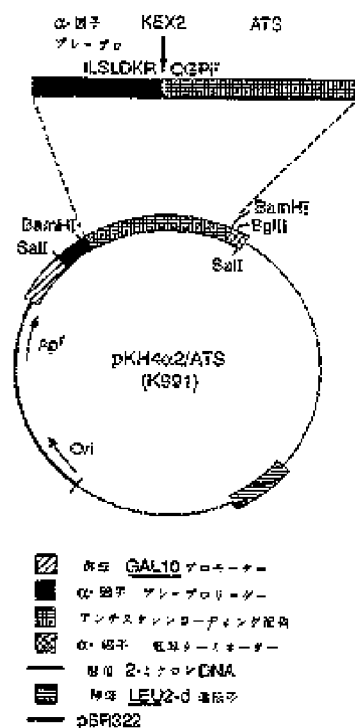


FIG. 8

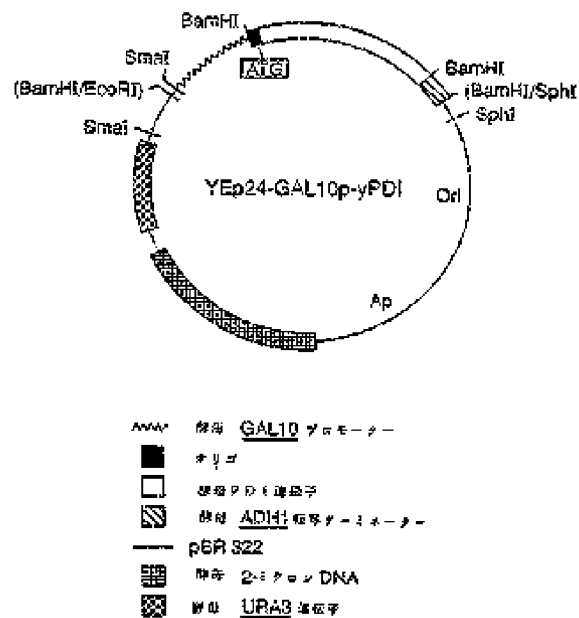


FIG. 9

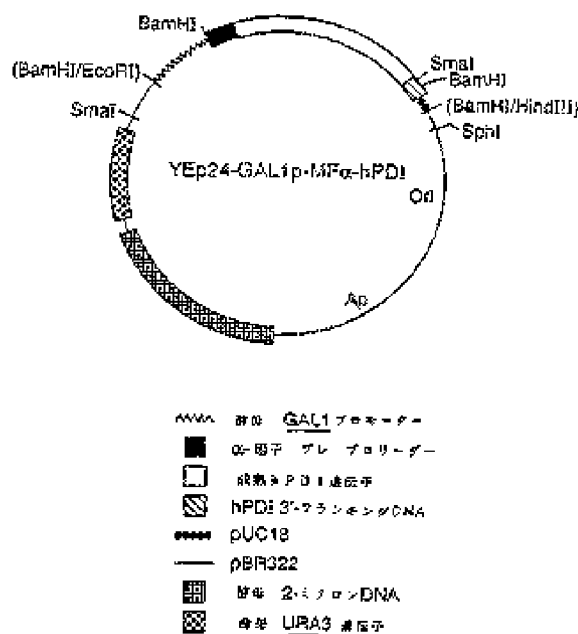


FIG. 10

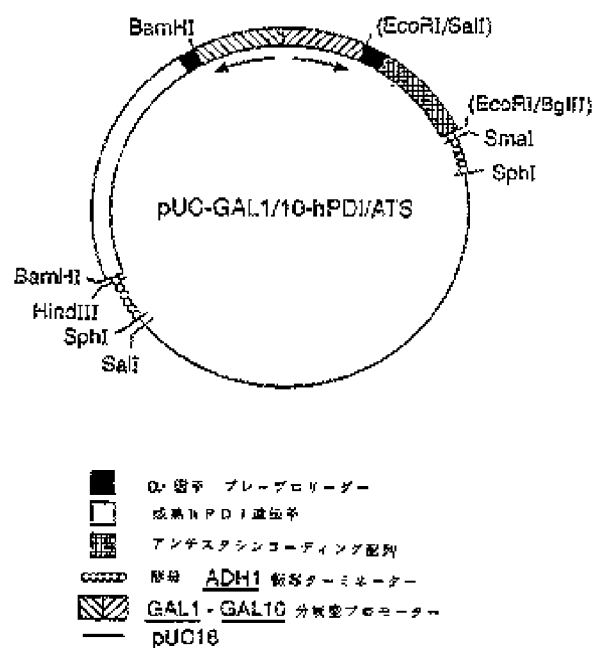


FIG. 11

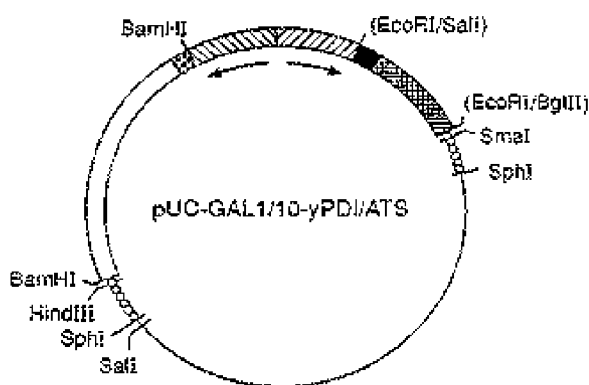


FIG. 12

[illegible]

| Citation and Document Numbers to be reviewed |  | Document numbers to be reviewed |
|--|--|---------------------------------|
| Category                                     | Character of document, not abstract, with reference of the review number   | Reference to class No.          |
| Y  | Year, Vol. 7, issued 1995, Schemm et al., "Characterization of the sequence of the yeast YOL133 gene localized on chromosome III. Homology with the protein disulfide isomerase (PDI) gene product of other organisms", pages 185-190. See index inside.                         | 1-94                            |
| Y  | EP, A. 0,293,993 (Hayashima et al.) 07 December 1986. See examples 2 and 3 especially.   | 9                               |
| Y  | The EMBO Journal, Vol. 6, No. 3, Rånby et al., "Molecular cloning of the beta-chain of human pectin 4-epimerase. The isozyme and protein disulfide isomerase are products of the same gene", pages 643-649. See the abstract on page 643 especially.                             | 17, 18, 21, 22, 31              |
| Y  | Gene, Vol. 75, issued 1989, Han et al., "Cloning and expression of cDNA encoding urease, a beta-barrel protein having anti-carcinoma and antineoplastic properties", pages 47-57. See pages 47 and 56 especially.  | 24, 30                          |
| Y  | The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 29, issued 15 October 1990, Moore et al., "Characterization of recombinant tick anticoagulant peptide: A highly selective inhibitor of blood coagulation factor Xa", pages 17746-17752. See pages 17746 and 17751 especially. | 15, 31                          |

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6  
 //(C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:865)  
 (C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 R 1:865)  
 (C 1 2 N 9/90  
 C 1 2 R 1:865)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US

(72) 発明者 トウイート、マイケル・エフ  
 イギリス国、ケント・シー・テュー・4・  
 7・エヌ・ビー、チャーナム・ハッチ、ナ  
 イティンゲイル・クロース・3

(72) 発明者 フリードマン、ロバート・ビー  
 イギリス国、ケント・シー・テュー・1・  
 1・エツクス・アール、カンタベリー、セ  
 ント・オーガスティンズ・ロード・43

(72) 発明者 シュルツ、ローレン・デュー  
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19438、  
 ハーリーズビル、オーク・ドライブ・421

(72) 発明者 エリス、ロナルド・ダブリュ  
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19066、  
 メリオン、シカモア・アベニュー・206

(72) 発明者 マークス、ヘンリー・ゼット  
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19095、  
 ウィンコート、ソーンベリー・ロード・  
 1517

(72) 発明者 モンゴメリー、ドナ・エル  
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア・18914、  
 チャルフォント、ヒツコリー・レーン・9